

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**Estudio de factores de predictibilidad: Expresión de  
IGF1-R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2 y VEGF  
en el cáncer colorrectal estenosante y no estenosante.**

Memoria para optar al grado de Doctor  
presentada por

**Alfonso Bermejo Navas**

Directores:

Dr. Antonio Galindo Galindo  
Prof. Dr. Luis Cristóbal Capitán Morales

Programa de doctorado:  
Investigación Biomédica

Línea de Investigación:  
Nuevos métodos y tecnologías en medicina y cirugía

**Sevilla, 2015**





*Dpto. de Cirugía*

*Facultad de Medicina*

*Universidad de Sevilla*



El **Dr. Antonio Galindo Galindo** y el **Prof. Dr. Luis Cristóbal Capitán Morales**,  
directores del trabajo,

### **CERTIFICAN**

Que D. **Alfonso Bermejo Navas**, Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla,  
ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral: **“Estudio de factores de predictibilidad: Expresión de IGF1-R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2 y VEGF en el cáncer colorrectal estenosante y no estenosante”** y que es apto para su defensa  
delante de un tribunal, para optar al título de Doctor en la Universidad de Sevilla.

Que este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Cirugía General y Digestiva de los  
Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla.

Para que conste a todos los efectos, se firma el presente certificado.

En Sevilla, a 8 de septiembre de 2015

Dr. Antonio Galindo Galindo  
Director.

Prof. Dr. Luis Capitán Morales  
Director y Tutor.





El presente estudio se realizó con la subvención para la financiación de Proyectos de Investigación y Planes de Formación Investigadora en Ciencias de la Salud de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

Nº Expediente: 0147/2006.



*“Un pájaro posado en un árbol nunca tiene miedo de que la rama se rompa,  
porque su confianza no está en la rama sino en sus propias alas”*

*Anónimo.*

*Dedicada a todos los que creyeron en mí*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera manifestar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Antonio Galindo, director de la presente tesis, por sus enseñanzas y apoyo, por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación biomédica aplicada.

Al Dr. Luis Capitán Morales, tutor y codirector de esta tesis doctoral, por su cooperación y accesibilidad en todo momento.

A mis compañeros de la Unidad de Cirugía de Urgencias, por toda su necesaria ayuda en el contexto clínico y el acercamiento a los pacientes.

A todos los trabajadores del Servicio de Anatomía Patológica, en especial a Carolina y María Ángeles (DEP), por su apoyo en el plano técnico. Mención especial a la Dra. Carmen Sáez, por sus consejos en la evaluación de los resultados de las reacciones.

A mis compañeros de laboratorio del IBiS, Ismael, Ana, Sonia y Javi, por estar ahí en los momentos malos, y por supuesto, por esas risas.

Gracias a mi familia y a todos aquellos que están cerca de mí, por su apoyo moral y afectivo.

A mis padres, por mi educación. A mis suegros por su esfuerzo en estos momentos.

A mi hijo, por regalarme su sonrisa cada día y en especial a Vanessa, mi esposa, por estar siempre a mi lado y creer en mí, por su paciencia en mis dudas. Sin su ánimo y confianza hubiera sido imposible llegar a este punto.

Gracias a todos.

Alfonso





## RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera neoplasia más frecuente y la cuarta causa de mortalidad por cáncer en el mundo, con índices de supervivencia que oscilan entre el 30 y el 65%, según la zona geográfica de residencia. El CCR es el responsable del 60-90% de todos los casos de obstrucción del colon, siendo la estenosis el problema quirúrgico agudo más común, su efecto debe verse afectado por la localización del tumor.

El propósito de este estudio fue la búsqueda de dianas potenciales en grupos de alto riesgo, precisando las causas por las que este tipo de neoplasias debutan como obstrucción intestinal y su efecto en el pronóstico vital del enfermo. Para ello, mediante técnicas inmunohistoquímicas, analizamos la expresión de IGF1-R, p73, MMR (MLH1, MSH2), COX-2 y VEGF en especímenes de CCR, pertenecientes a pacientes con un tiempo de seguimiento de 5 años.

El CCR obstructivo se ha presentado como un factor predictor clínico y vital del paciente, asociándose a un estadio más avanzado de la enfermedad. Nuestro modelo experimental sugiere que VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 e índice de proliferación celular, tienen un impacto potencial en la carcinogénesis y en la historia natural de la neoplasia. La patología obstructiva, con un diámetro ostensiblemente mayor del tumor, la invasión de nodos linfáticos adyacentes, la presencia de valores elevados de VEGF, p73, y Ki-67, son importantes elementos en el índice de riesgos de la recurrencia de la enfermedad y en la supervivencia. La detección de niveles de antígeno carcinoembrionario postoperatorio fue una buena herramienta suplementaria en el seguimiento oncológico.



## **ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy and the fourth leading cause of cancer mortality in the world, with survival rates ranging between 30 and 65% depending on the geographical area of residence. The CRC is responsible for 60-90% of all cases of colon obstruction, stenosis being the most common acute surgical problem, its effect should be affected by the location of the tumor.

The purpose of this study was to search for potential targets in high-risk groups, specifying the reasons why this type of tumor debut as intestinal obstruction and its effect on the prognosis of the patient. We analysed, using immunohistochemical staining, the expression of IGF1-R, p73, MMR (MLH1, MSH2), COX-2 and VEGF in specimens of CRC, belonging to patients with follow-up time of 5 years.

Obstructive CRC has been presented as a clinical and vital predictor of patient, associated to a more advanced stage of the disease. Our experimental model suggests that VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 and cell proliferation index, have potential in carcinogenesis and in the natural history of neoplasia. The obstructive disease with a markedly greater tumour diameter, invasion of adjacent lymph nodes, the presence of high levels of VEGF, p73 and Ki-67 are important elements in the index risk of recurrence of the disease and the survival of patients. The detection of carcinoembryonic antigen levels after surgery was a good supplementary tool in monitoring for cancer.



## CLAVE ABREVIATURAS

ABC	Avidina-biotina-peroxidasa
AJCC	Comité Estadounidense sobre el cáncer
APC	Adenomatous polyposis coli
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CA19-9	Antígeno Carbohidrato 19-9
CCE	Cáncer Colorrectal Estenosante
CCNE	Cáncer Colorrectal No Estenosante
CCR	Cáncer Colorrectal
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CU	Colitis Ulcerosa
Da	Dalton
DAB	Diaminobencidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enfermedad de Crohn
ECO	Ecografía
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ETM	Escisión total mesorrecto
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
HBsAg	Antígeno de superficie de hepatitis B
HNPCC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
HRP	Peroxidasa de rábano
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IGF-1R	Receptor de factor de crecimiento insulínico tipo I
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo II

IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Índice de Proliferación
kDa	Kilodalton
LOH	Pérdida de heterocigosidad
LSAB	Biotina-estreptavidina marcada
MLH-1	Proteína de reparación de ADN MLH-1
MMP	Fenotipo Mutador Microsatélite
MMR	Sistema de reparación de pérdidas
MSH-2	Proteína de reparación de ADN MSH-2
MSH-6	Proteína de reparación de ADN MSH-6
MSI-H	Alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites
NaCl	Cloruro Sódico
PAP	Peroxidasa-antiperoxidasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG2	Prostaglandina E2
PET	Tomografía por emisión de positrones
RGB	Rojo-Verde-Azul
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEER	Epidemiología y resultados de vigilancia
TAC	Tomografía axial computarizada
TNM	Sistema estadiaje Tumor, Nodo, Metástasis
UICC	Unión internacional contra el cáncer
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>Pág. 21</b>
<b>1.1. Epidemiología.....</b>	<b>Pág. 23</b>
1.1.1 Prevalencia CCR.....	Pág. 23
1.1.2 Factores etiopatogénicos.....	Pág. 24
<b>1.2. Aspectos Clínicos CCR.....</b>	<b>Pág. 27</b>
1.2.1 Presentación, signos y síntomas.....	Pág. 27
1.2.2 Complicaciones CCR.....	Pág. 28
1.2.3 Imagen.....	Pág. 28
1.2.4 CEA.....	Pág. 29
1.2.5 Tratamiento.....	Pág. 30
<b>1.3. Aspectos Anatomopatológicos del CCR.....</b>	<b>Pág. 33</b>
1.3.1 Localización.....	Pág. 33
1.3.2 Histopatología.....	Pág. 33
1.3.3 Progresión.....	Pág. 34
1.3.4 Estadificación.....	Pág. 35
1.3.5 Carcinogénesis.....	Pág. 38
<b>1.4. Estudio IHQ de marcadores.....</b>	<b>Pág. 40</b>
1.4.1 Deficiencias de MMR.....	Pág. 40
1.4.2 Reguladores del ciclo celular.....	Pág. 42
1.4.3 Progresión mediante factores de crecimiento.....	Pág. 42
1.4.4 Promoción y Metástasis.....	Pág. 44
1.4.5 Índice de Proliferación celular.....	Pág. 45
1.4.6 Infiltrado Linfocitario tumoral.....	Pág. 46
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>Pág. 47</b>
<b>2.1. Hipótesis.....</b>	<b>Pág. 49</b>
<b>2.2. Objetivos.....</b>	<b>Pág. 51</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>Pág. 53</b>
<b>3.1. Diseño del estudio.....</b>	<b>Pág. 55</b>
<b>3.2. Sujetos y grupos de estudio.....</b>	<b>Pág. 55</b>
<b>3.3. Criterios de Inclusión y Exclusión.....</b>	<b>Pág. 55</b>
<b>3.4. Justificación del tamaño muestral.....</b>	<b>Pág. 56</b>
<b>3.5. Búsqueda y revisión de historias clínicas.....</b>	<b>Pág. 56</b>
<b>3.6. Variables.....</b>	<b>Pág. 57</b>
3.6.1 Características demográficas.....	Pág. 57
3.6.2 Características clínicas.....	Pág. 57
3.6.3 Características histopatológicas.....	Pág. 58
3.6.4 Seguimiento oncológico.....	Pág. 59
<b>3.7. Registro y recogida de muestras tumorales.....</b>	<b>Pág. 61</b>
<b>3.8. Puesta a punto de técnicas experimentales.....</b>	<b>Pág. 62</b>
<b>3.9. Análisis inmunohistoquímico.....</b>	<b>Pág. 63</b>
3.9.1 Preparación cortes.....	Pág. 63
3.9.2 Desenmascaramiento epítomos.....	Pág. 63
3.9.3 Saturación Peroxidasas.....	Pág. 64
3.9.4 Bloqueo uniones inespecíficas.....	Pág. 64
3.9.5 Incubación anticuerpo primario.....	Pág. 64
3.9.6 Incubación complejo secundario.....	Pág. 67
3.9.7 Revelado.....	Pág. 67
3.9.8 Limitaciones de la técnica.....	Pág. 68
<b>3.10. Evaluación del ensayo.....</b>	<b>Pág. 69</b>
3.10.1 Semicuantitativo.....	Pág. 69
3.10.2 Análisis de imagen.....	Pág. 71
<b>3.11. Análisis descriptivo y estadístico.....</b>	<b>Pág. 73</b>
<b>3.12. Limitaciones del Estudio.....</b>	<b>Pág. 74</b>
<b>3.13. Reactivos.....</b>	<b>Pág. 75</b>
3.13.1 Anticuerpos primarios.....	Pág. 75
3.13.2 Sistema de revelado.....	Pág. 78
3.13.3 Otros.....	Pág. 79



<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>Pág. 83</b>
<b>4.1. Datos de la muestra.....</b>	<b>Pág. 85</b>
4.1.1 Características demográficas.....	Pág. 86
4.1.2 Características clínicas.....	Pág. 86
4.1.3 Características histopatológicas.....	Pág. 88
4.1.4 Seguimiento oncológico.....	Pág. 89
<b>4.2. Estenosis.....</b>	<b>Pág. 90</b>
4.2.1 Estenosis y variables clínico-patológicas.....	Pág. 90
4.2.2 Estenosis y aparición de recidiva.....	Pág. 93
4.2.3 Estenosis y supervivencia.....	Pág. 94
<b>4.3. MSI.....</b>	<b>Pág. 95</b>
<b>4.4. VEGF.....</b>	<b>Pág. 97</b>
4.4.1 Expresión VEGF.....	Pág. 97
4.4.2 VEGF y variables clínico-patológicas.....	Pág. 99
4.4.3 VEGF y aparición de recidiva.....	Pág. 101
4.4.4 VEGF y supervivencia.....	Pág. 102
<b>4.5. COX-2.....</b>	<b>Pág. 103</b>
4.5.1 Expresión COX-2.....	Pág. 103
4.5.2 COX-2 y variables clínico-patológicas.....	Pág. 105
4.5.3 COX-2 y aparición de recidiva.....	Pág. 107
4.5.4 COX-2 y supervivencia.....	Pág. 108
<b>4.6. IGF-1R.....</b>	<b>Pág. 109</b>
4.6.1 Expresión IGF-1R.....	Pág. 109
4.6.2 IGF-1R y variables clínico-patológicas.....	Pág. 111
4.6.3 IGF-1R y aparición de recidiva.....	Pág. 113
4.6.4 IGF-1R y supervivencia.....	Pág. 114
<b>4.7. p73.....</b>	<b>Pág. 115</b>
4.7.1 Expresión p73.....	Pág. 115
4.7.2 p73 y variables clínico-patológicas.....	Pág. 117
4.7.3 p73 y aparición de recidiva.....	Pág. 119
4.7.4 p73 y supervivencia.....	Pág. 120
<b>4.8. Ki-67 (Índice de Proliferación).....</b>	<b>Pág. 121</b>
4.8.1 Expresión Ki-67.....	Pág. 121
4.8.2 Ki-67 y variables clínico-patológicas.....	Pág. 123
4.8.3 Ki-67 y aparición de recidiva.....	Pág. 125
4.8.4 Ki-67 y supervivencia.....	Pág. 126

4.9. Coexpresión VEGF, COX-2, IGF-1R, p73, Ki-67.....	Pág. 127
4.10. Análisis Multivariante.....	Pág. 130
4.10.1 Estenosis.....	Pág. 130
4.10.2 Recidiva y Supervivencia.....	Pág. 131
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>Pág. 133</b>
5.1. Características de los pacientes y la neoplasia.....	Pág. 136
5.2 Estenosis.....	Pág. 140
5.3 Estudio IHQ de marcadores.....	Pág. 142
5.3.1 Análisis de expresión IHQ.....	Pág. 142
5.3.2 MSI.....	Pág. 144
5.3.3 VEGF.....	Pág. 145
5.3.4 COX-2.....	Pág. 147
5.3.5 IGF-1R.....	Pág. 148
5.3.6 p73.....	Pág. 149
5.3.7 Ki-67.....	Pág. 151
5.3.8 Correlación de expresión.....	Pág. 152
5.4. Análisis Multivariante.....	Pág. 155
5.4.1 Estenosis.....	Pág. 155
5.4.2 Recidiva y Supervivencia.....	Pág. 156
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>Pág. 159</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>Pág. 163</b>
<b>8. ANEXOS: Cuaderno Recogida Datos (CRD).....</b>	<b>Pág. 187</b>

## **I.- INTRODUCCIÓN**



## **1.1.- EPIDEMIOLOGÍA**

### **1.1.1.- Prevalencia CCR**

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera neoplasia más frecuente y la cuarta causa de mortalidad por cáncer en el mundo, con 1,2 millones de casos nuevos cada año y 600.000 muertes por año. Numerosos estudios epidemiológicos muestran la variación de la prevalencia según la zona geográfica, las regiones con mayor incidencia registrada son Europa, América del Norte y Oceanía, a diferencia de Asia y África donde se presenta el menor número de casos por habitante. Se trata de una neoplasia cuya incidencia está experimentando un aumento considerable en los países occidentales <sup>1</sup>. Los datos de la SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) predicen una supervivencia relativa a los 5 años del 65% entre la población de EEUU, Australia y Canadá, esta mortalidad iría en aumento en regiones con bajo poder adquisitivo <sup>2</sup>. Los registros de tumores Europeos notifican una supervivencia aproximada del 54%, incluso en el este de Europa y China se observa una supervivencia inferior al 30% <sup>3</sup>.

Su incidencia en España es equivalente a la de otros países occidentales, con una cifra estimada de 32240 casos nuevos por año y una tasa anual de 25,8/100000 hab/año para los hombres y 15,8/100000 hab/año para las mujeres, siendo la sexta causa de fallecimiento en España (14833 personas en el año) <sup>4</sup>.

En Andalucía el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer y la más prevalente en ambos sexos. Los datos de incidencia de neoplasias en nuestra comunidad, reflejan un aumento de estos tumores tanto en hombres (2893 nuevos casos) como en mujeres (2270 nuevos casos). Se estima que en los próximos años, el número de fallecimientos en nuestra comunidad autónoma a causa de CCR, será de 6393 hombres (11% de todos los cánceres) y de 5101 mujeres (16%) <sup>5</sup>.

### **1.1.2.- Factores etiopatogénicos**

Aunque el conocimiento de los factores etiológicos de CCR aún es limitado, el estilo de vida y la dieta diaria pueden ser considerados importantes, postulándose que estos factores junto con factores genéticos subyacentes, podrían ser variables importantes que explicarían la disparidad en la incidencia entre las regiones geográficas <sup>6</sup>.

Se ha demostrado que los sujetos que residen en un país de baja incidencia adoptan un riesgo más elevado cuando emigran a un país de alto riesgo, observándose una incidencia próxima a los países de residencia y no a la de los países de origen <sup>7</sup>.

Los factores dietéticos más relevantes son, la ingesta excesiva de calorías en relación con los requerimientos, el bajo contenido de fibras vegetales inabsorbibles, el alto contenido de hidratos de carbono refinados, el consumo de carnes rojas, y la disminución de micronutrientes protectores. Se considera que la disminución del consumo de fibra conduce a un menor volumen y a un aumento del tiempo del tránsito en el intestino, y a alteraciones de la flora bacteriana intestinal. Los productos colaterales oxidantes, potencialmente tóxicos, de la degradación de hidratos de carbono por bacterias se encontrarían presentes a concentraciones más altas en las heces y se mantienen en contacto con la mucosa del colon durante periodos de tiempo más largos. Además, la alta ingesta de colesterol con carnes rojas potencia la síntesis de ácidos biliares que pueden ser convertidos en carcinógenos potenciales por las bacterias intestinales. Las dietas refinadas contienen también menos vitaminas A, C y E, capaces de actuar como aceptores de radicales de oxígeno <sup>8,9</sup>.

Pero aunque existen muchas especulaciones interesantes <sup>10</sup>, aun no se conocen con exactitud los mecanismos responsables de los posibles efectos de la dieta en la etiopatogenia del CCR.

La distribución por sexos de las neoplasias malignas colorrectales es prácticamente igual entre varones y mujeres, aunque existen algunas revisiones que otorgan al sexo masculino la posibilidad de ser un factor de riesgo <sup>1,11</sup>.

Respecto a la edad, la probabilidad de padecer cáncer colorrectal aumenta significativamente después de los 50 años y se incrementa bruscamente a partir de los 55 años. El 90 % de los casos de CCR esporádico aparece después de los 50 años de edad. La aparición por debajo de los 40 años supone menos de un 5% de los casos diagnosticados <sup>12</sup>.

Otro factor etiológico importante es la inflamación crónica, como demuestra la mayor incidencia de CCR entre los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII). El riesgo aumenta después de los 8-10 años de la enfermedad y es mayor en pacientes con inicio temprano y afectación extensa <sup>13</sup>. Los pacientes con Colitis Ulcerosa padecen una incidencia de CCR mayor que el resto de la población <sup>14</sup>. En los pacientes con Enfermedad de Crohn el riesgo de CCR es también más alto que el de la población normal, y existe riesgo de adenocarcinoma de intestino delgado y grueso <sup>15</sup>. Los CCR asociados a las EII por lo general se caracterizan por ser sincrónicos, infiltrativos, mucinosos y con células en anillo de sello <sup>16</sup>.

Los antecedentes familiares de CCR parecen influir en el riesgo y la incidencia global, la mayoría de los estudios ha demostrado una incidencia entre dos y cuatro veces mayor de CCR en los pacientes con familiares de primer grado afectados <sup>17</sup>.

La implicación de factores genéticos en la etiopatogenia del CCR es obvia, como demuestran la alta predisposición en los pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP), que alcanza el 100% a los 50 años; y los pacientes con Síndrome de Lynch o Síndrome de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer), que desarrollan CCR en el 80- 90% de los casos <sup>18</sup>.

Los pacientes con FAP presentan numerosos pólipos adenomatosos, que tienden a progresar a CCR, junto a otras manifestaciones. La enfermedad, que se hereda de forma autosómica dominante, se caracteriza por una mutación en el gen APC (Adenomatous Poliposis Coli), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21-22). Los criterios diagnósticos actuales establecidos para diagnosticar esta enfermedad son los siguientes: 100 o más adenomas colorrectales, o mutación germinal del gen APC, o

historia familiar de FAP junto a al menos una de las siguientes manifestaciones: quistes epidermoides, osteomas o tumor desmoide. Los adenomas de los pacientes con FAP presentan morfología tubular y recuerdan a los adenomas esporádicos, con una distribución más frecuente en recto y sigma. Lo más importante de esta enfermedad es su invariable progresión a CCR a una edad media de 40 años. El CCR de la FAP es histológicamente idéntico al esporádico <sup>19</sup>.

El HNPCC (Síndrome de Lynch) es una enfermedad también autosómica dominante, caracterizada por el desarrollo de CCR, carcinoma endometrial, cáncer de intestino delgado, uréter o pelvis renal. Los criterios diagnósticos actuales de esta enfermedad se han modificado con el tiempo, debido a que los criterios *Amsterdam II* <sup>20</sup>, son estrictos y difíciles de cumplir, se han propuesto los criterios de *Bethesda* revisados <sup>21</sup>: CCR diagnosticado antes de los 50 años, presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otra neoplasia relacionada, paciente con CCR y uno o más familiares de 1º grado con CCR o neoplasia relacionada, y paciente con CCR y dos o más familiares de 1º y 2º grado con CCR o neoplasia relacionada.

Las lesiones colorrectales de los pacientes con HNPCC se presentan a edad más temprana y en localización proximal. Los adenomas que aparecen en los pacientes con HNPCC tienen morfología vellosa y son más displásicos que los adenomas detectados en la población general, y aunque se pueden observar en gran número, nunca llegan a presentar una poliposis florida <sup>22</sup>.

CCR sincrónicos o metacrónicos se han observado en el 35% de los pacientes, y el 90% de los casos muestran inestabilidad de microsatélites (MSI).

Las dos terceras partes de las neoplasias malignas colorrectales se desarrollan en personas sin factor de riesgo conocido. El resto se asocian a historia personal o familiar de pólipos adenomatosos o cáncer colorrectal, a síndromes de cáncer colorrectal hereditario y a enfermedad inflamatoria intestinal <sup>23</sup>.



## **1.2.- ASPECTOS CLÍNICOS CCR (CCE y CCNE)**

### **1.2.1.- Presentación, signos y síntomas**

La mayoría de los cánceres colorrectales son diagnosticados en pacientes asintomáticos. Cuando presentan síntomas éstos dependen de la localización del tumor primario. Dado que el cáncer en estadios iniciales no suele producir síntomas y la mayoría de los síntomas son inespecíficos, los esfuerzos a través de los programas de detección son esenciales.

Sus manifestaciones clínicas son variadas, estando en ocasiones en relación con las diferentes ubicaciones posibles de la neoplasia a lo largo del intestino grueso. Las neoplasias de colon ascendentes tienden a aumentar de tamaño antes de producir síntomas en comparación con las de colon descendente y recto. Los tumores de colon ascendente se suelen manifestar con síntomas inespecíficos secundarios, como fatiga, disnea, angina y anemia microcítica. También puede presentarse como molestia abdominal vaga o dar lugar a masa palpable. La obstrucción en esta localización es poco frecuente debido al gran diámetro del ciego y colon ascendente, aunque si invade la válvula ileocecal puede obstruir distalmente el intestino delgado.

El colon descendente y la región sigmoidea tienen una luz más estrecha que el colon proximal. Los tumores a este nivel poseen frecuentemente un patrón circunferencial y ocasionan síntomas obstructivos. La clínica típica es de dolor abdominal tipo cólico y cambio en el ritmo intestinal.

En conclusión, la obstrucción intestinal es una de estas manifestaciones, tratándose de un cuadro clínico que, en la mayor parte de las ocasiones, condiciona una intervención quirúrgica urgente para su resolución. De otra forma, el cáncer colorrectal también puede manifestarse en forma de dolor abdominal, rectorragias, melenas e incluso ser un hallazgo casual <sup>24</sup>.

Así pues, podemos distinguir entre tumores que se comportan de forma estenosante (carcinoma de colon estenosante, CCE) y tumores que no siguen este comportamiento (carcinoma de colon no estenosante, CCNE), con diferente expresión clínica.

### **1.2.2.- Complicaciones del CCR: Clínica de la obstrucción intestinal por neoplasia colorrectal.**

Un tercio de los pacientes con cáncer de colon y el 15% de los de recto se presentan como situaciones de urgencia, bien como obstrucción (80%), bien como perforación (15%). La hemorragia masiva es una complicación rara del cáncer colorrectal.

El CCR es el responsable del 60-90% de todos los casos de obstrucción aguda del colon. La mayoría de los cánceres que causan esta complicación se localizan en el colon izquierdo. Las contracciones del colon proximal a la obstrucción son responsables del dolor cólico característico. La obstrucción persistente lleva a la hipomotilidad y a la distensión progresiva con secuestro de líquido, que contribuye a la deshidratación. La distensión progresiva en presencia de válvula ileocecal competente aumenta la presión dentro del colon hasta el punto de causar isquemia irreversible de la mucosa. En casos extremos la distensión puede conducir a la perforación del ciego.

Los pacientes con obstrucción intestinal mecánica presentan dolor abdominal, reducción o cese completo del paso de gases y/o heces y distensión abdominal progresiva. El dolor abdominal, particularmente si está asociado con fiebre y leucocitosis, requiere la evaluación inmediata para descartar la perforación o la isquemia. La mayoría de las perforaciones ocurren en el tumor, pero los pacientes con cáncer de colon izquierdo obstruido la perforación puede producirse en el ciego <sup>25</sup>.

### **1.2.3.- Imagen**

La progresión hasta el CCR desde su precursor, el adenoma, justifica la necesidad de técnicas de detección precoz de lesiones premalignas. Tradicionalmente se ha realizado con enemas de bario y colonoscopia.

Actualmente se dispone de varios métodos diagnósticos en la detección de pólipos y CCR, como son el TAC, que permite la detección de lesiones de pequeño tamaño y se presenta como técnica de elección para la estadificación del CCR. La resonancia magnética (RMN) queda reservada para la estadificación local del cáncer de recto, para resolver dudas diagnósticas y como técnica de evaluación prequirúrgica en la resección de metástasis hepáticas.

La endoscopia aparece como método que permite visualizar directamente toda la superficie del intestino grueso y tomar biopsias de lesiones identificadas. Aunque existe la posibilidad de que la colonoscopia sea incompleta debido a la existencia de neoplasias obstructivas que impiden la progresión del endoscopio. Ante esta situación se presenta una nueva técnica, la TC colonografía (colonoscopia virtual), que es un procedimiento cada vez más extendido en la detección del CCR. Es un método, que utiliza dosis bajas de radiación, muchas veces no supera la de un enema opaco convencional, y permite la reconstrucción 3D de la zona estudiada y la estadificación del proceso tumoral al explorar el resto de la cavidad peritoneal y tórax <sup>26</sup>.

#### **1.2.4.- CEA**

El Antígeno Carcinoembrionario (CEA), es una glicoproteína de alto peso molecular, perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas. Juega un papel fundamental en fenómenos biológicos de adhesión, inmunidad y apoptosis de células tumorales <sup>27</sup>. Aunque es producida durante el desarrollo fetal, no se encuentran valores elevados en adultos.

Entre los numerosos marcadores tumorales, es el más común junto con CA19-9, en el diagnóstico del carcinoma colorrectal <sup>28</sup>.

El CEA ha sido detectado en el suero del 72-97% de los pacientes con CCR. Los valores elevados desaparecen tras la resección tumoral, entre la cuarta y la sexta semana después de la cirugía, reapareciendo en los casos de recurrencia y metástasis. Valores

elevados persistentes o en aumento indican persistencia de la enfermedad o recidiva de la misma <sup>29</sup>.

Los valores más altos se asocian a tumores que se extienden más allá de la pared intestinal, a los mejor diferenciados y a tumores con invasión vascular, linfática y perineural <sup>30</sup>. Pero su elevación no es específica, se detectan niveles altos de CEA en carcinomas de otras localizaciones (estómago, páncreas, mama y próstata), y en pacientes con enfermedad hepática o renal. Debido a que puede no estar elevado en estadios muy iniciales, no se considera un buen método de *screening*. Se utiliza principalmente para monitorizar el tratamiento y para la detección precoz de metástasis, presentándose como principal test costo-beneficio en la detección de enfermedad recurrente <sup>31</sup>.

#### **1.2.5.- Tratamiento**

El tratamiento quirúrgico estándar del cáncer de colon consiste en la resección del segmento de colon afecto por el tumor con los correspondientes ganglios linfáticos situados en el mesocolon que lo acompaña y los vasos sanguíneos que lo irrigan. Es la principal opción terapéutica potencialmente curativa en el CCR localizado.

Se consideran cuatro tipos de intervenciones quirúrgicas según el tumor se localice en el colon ascendente, transverso, descendente o sigma. La colectomía derecha incluye la sección proximal de los vasos ileocólicos, cólicos derechos y la rama derecha de los vasos cólicos medios. Si el tumor se localiza en colon transverso se amplía esta sección al origen de los vasos cólicos medios.

Si el tumor se encuentra en el colon descendente se realiza una colectomía izquierda. En este caso la sección incluye la ligadura de la arteria mesentérica inferior proximal al origen de la arteria cólica izquierda. Si el tumor se encuentra en sigma la ligadura de la arteria mesentérica inferior se puede realizar distal al origen de la arteria cólica izquierda. Respecto a los tumores localizados en la flexura esplénica existen dos

opciones. Algunos cirujanos realizan una colectomía izquierda y otros prefieren una colectomía derecha ampliada practicando una anastomosis íleo-cólica.

Una resección de 5 cm de intestino sano a cada lado del tumor, se considera oncológicamente adecuado para minimizar el riesgo de recurrencia. La mayoría de las veces, este margen quirúrgico es superado debido a la necesidad de incluir en la resección todo el drenaje linfático del segmento del colon afectado con su correspondiente irrigación. La longitud del íleon terminal resecado en un tumor de colon ascendente no parece influir en la recurrencia local, por lo que se resecará el mínimo íleon distal para prevenir trastornos de malabsorción <sup>32</sup>.

En los casos de cirugía de urgencia por oclusión intestinal, perforación o hemorragia deberá intentarse una cirugía radical con resección y anastomosis en los tumores del lado derecho. Sin embargo, y sobre todo en las lesiones del lado izquierdo puede ser necesaria la resección en bloque más colostomía del muñón cólico proximal y cierre del muñón distal (operación de *Hartmann*) <sup>33</sup>.

Respecto al tratamiento quirúrgico del cáncer de recto, se han introducido cambios importantes en los últimos años, fundamentalmente la escisión total del mesorrecto (ETM) <sup>34</sup>. Esta técnica consiste en la exéresis del recto conjuntamente con el mesorrecto de alrededor y la fascia mesorrectal que lo envuelve preservando los nervios autónomos de la pelvis. El mesorrecto está constituido por tejido graso que contiene estructuras linfáticas, vasculares y nerviosas, y que rodea el recto de forma circunferencial desde el promontorio sacro para luego descender mientras se estrecha hasta debajo de la fascia de *Waldeyer* alrededor de los músculos elevadores del ano a nivel del tercio distal del recto. La importancia de realizar una ETM radica en que se incluyen la mayoría de los ganglios de drenaje del tumor así como posibles depósitos tumorales en la grasa <sup>35</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado la importancia de conseguir un margen circunferencial libre de enfermedad. Un margen circunferencial libre de enfermedad se considera una distancia superior a 1 mm entre el borde del tumor y el margen de resección de la pieza

quirúrgica. Los pacientes con margen circunferencial afecto presentan un riesgo de recurrencia local y desarrollo de metástasis mayor <sup>36</sup>.

La técnica quirúrgica del cáncer de recto varía en función de la localización del tumor. El recto se divide en tres partes, el recto superior (de 11 a 15 cm del margen anal), medio (de 7 a 11 cm del margen anal) e inferior (de 3-4 a 7 cm del margen anal). En los tumores del recto superior se recomienda un margen distal mínimo de 4 cm <sup>32</sup>. En estos casos no es necesaria la ETM sino que es suficiente con la sección parcial del mesorrecto. En cambio, para los tumores de recto medio e inferior es necesario realizar una ETM. Para los tumores situados hasta 5 cm del margen anal, un margen distal de resección de 1 cm es oncológicamente aceptable. Cuando el tumor afecta el complejo esfinteriano está indicado realizar una amputación abdominoperineal de *Miles*.

Actualmente las resecciones de CCR pueden realizarse por vía laparoscópica. Se ha demostrado que es una vía segura, que ofrece ventajas clínicas en el postoperatorio inmediato sin aumentar la morbilidad a corto plazo comparándolo con la vía abierta tanto en colon como en recto <sup>37</sup>.

Sin embargo, en enfermedades diseminadas, la cirugía debe apoyarse en un tratamiento adyuvante.

El papel de la quimioterapia y radioterapia pre y postoperatoria en casos operables de CCR, y particularmente de recto, ha sido ampliamente investigado; algunos estudios muestran una disminución de las recurrencias locales y un aumento de supervivencia en los pacientes con carcinoma rectal tratados con quimioterapia y radioterapia postoperatoria <sup>38</sup>. Trabajos de grupos europeos han mostrado un aumento de supervivencia con radioterapia preoperatoria combinada con escisión total mesorrectal <sup>39</sup>.

Las metástasis hepáticas y de otros órganos, únicas o incluso múltiples, también se pueden beneficiar del tratamiento quirúrgico.

Por último, han aparecido nuevos métodos dirigidos en el tratamiento de la enfermedad, como son el uso de anticuerpos monoclonales en la inhibición de receptores de factores

de crecimiento <sup>40</sup>. El uso de cetuximab, panitumumab y bevacizumab, solos o en combinación con quimioterapia han dado buenos resultados como terapia combinada de la patología <sup>41, 42</sup>, a pesar de algunos efectos secundarios adversos <sup>43</sup>.

### **1.3.- ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DEL CCR**

#### **1.3.1.- Localización**

Aproximadamente el 55% de los CCR se localizan en la región rectosigmoidea, en ciego y colon ascendente el 22%, en colon transverso el 11%, y en otras zonas el 6% <sup>44</sup>. Se ha descrito cierta correlación entre la localización del tumor, la epidemiología y los hallazgos clínico-patológicos <sup>45</sup>. Así se ha visto que los tumores localizados en colon derecho se presentan con más frecuencia en mujeres, de avanzada edad, pobremente diferenciados y con alto contenido de mucina. Mientras que el colon izquierdo es frecuente en hombres de mediana edad y del tipo polipoide <sup>46, 46</sup>.

Se ha llegado incluso a plantear la posibilidad de diferencias en la expresión genética en función de la localización del tumor <sup>47</sup>.

#### **1.3.2.- Histopatologías**

El CCR es un carcinoma que se origina en el epitelio columnar del intestino grueso, entre el 90-95% de los tumores son adenocarcinomas. Las células tumorales forman glándulas que se asemejan a las criptas del epitelio normal, denominándose tumores diferenciados (>95% del tumor forma glándulas).

El término de adenocarcinoma indiferenciado es usado para describir neoplasias epiteliales en las cuales no se diferencian formas tubulares o glándulas (<50% del tumor forma glándulas), caracterizándose por la uniformidad morfológica celular, las células tumorales crecen infiltrando difusamente o formando cordones sin un claro patrón glandular <sup>48</sup>.

La mayoría de los tumores malignos del colon son adenocarcinomas moderadamente diferenciados (50-95% del tumor forma glándulas), que secretan cantidades variables de mucina. Pero las características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, varían de unos tumores a otros, e incluso dentro del mismo tumor, por lo que la clasificación depende del número de muestras analizadas y del sitio del que se tomen <sup>49</sup>.

Son características de algunos tumores las células “en anillo de sello”, en las que una gran vacuola de mucina desplaza el núcleo hacia la periferia <sup>50</sup>.

El 15% aproximadamente de los tumores presenta grandes lagos de mucina, con colecciones diseminadas de células tumorales. Estos carcinomas mucinosos o coloides son más frecuentes en pacientes con HNPCC y en pacientes jóvenes <sup>51</sup>.

Menos del 10% de las neoplasias colorrectales no son adenocarcinomas. Los tumores de la unión anorrectal son carcinomas de células escamosas, cloacogénicos o de células de transición <sup>52</sup>. Los tumores carcinoides del intestino grueso y los linfomas primarios son menos del 0,1% de las neoplasias colorrectales.

### **1.3.3.- Progresión**

El CCR progresa extendiéndose a través de la pared intestinal alcanzando tejidos pericólicos y perirrectales, y pudiendo afectar, en aquellos casos más avanzados, estructuras adyacentes. Las consecuencias de la extensión directa de la neoplasia dependen principalmente de la localización anatómica de la lesión: en el caso de carcinomas rectales se pueden ver afectadas estructuras pélvicas como vagina o vejiga; y en los tumores colónicos se puede afectar directamente la cavidad peritoneal. La afectación de la superficie peritoneal debe ser diagnosticada sólo en aquellos casos en los que el peritoneo está ulcerado, o se observan claramente células neoplásicas penetrando en el mesotelio <sup>44</sup>.

La extensión por vía tanto linfática como vascular, se ha observado que puede ocurrir desde fases muy tempranas de la historia natural del CCR, y se asocia a peor pronóstico



<sup>53, 54</sup>. Se ha descubierto que las metástasis ganglionares son más frecuentes en los tumores pobremente diferenciados y en los de patrón de crecimiento muy infiltrante, y tienen una significación pronóstica muy relevante, por lo que se debe realizar un estudio muy minucioso de los ganglios linfáticos en las piezas de resección intestinal <sup>55</sup>. Las últimas recomendaciones estiman que se deben localizar un mínimo de 14 a 15 ganglios linfáticos en cada pieza de resección de CCR para realizar un estudio correcto de la afectación ganglionar <sup>56</sup>. La presencia de micrometástasis ganglionares puede ser detectada tras la realización de cortes seriados y estudio inmunohistoquímico, o con los nuevos sistemas de detección molecular, pero su significación pronóstica aún no está del todo establecida <sup>57</sup>.

En cuanto a las metástasis extranodales, el órgano más frecuentemente afectado por metástasis de CCR es el hígado, y son más frecuentes en aquellos tumores que muestran invasión vascular <sup>58</sup>. También se pueden observar metástasis en otros órganos como peritoneo, pulmón y ovario; y de forma mucho más infrecuente se han detectado metástasis en otras localizaciones como SNC, hueso, testículo, útero o cavidad oral <sup>59</sup>.

#### **1.3.4.- Estadificación**

La estadificación del cáncer colorrectal es necesaria para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados del tratamiento. Constituye una parte esencial y punto de referencia de los denominados factores pronósticos. Así se demuestra por ejemplo que la presencia de obstrucción o perforación son factores clínicos de mal pronóstico <sup>60, 61</sup>.

Se han descrito diversos sistemas de estadiaje de cáncer colorrectal, como el sistema de *Dukes* y sus derivados <sup>62</sup>, el sistema de *Astler y Coller* <sup>63</sup>, pero sin duda el más empleado en la actualidad es el TNM (Tumor, Nodo, Metástasis), propuesto por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC) <sup>64</sup> (Tabla 1.3.4).

La AJCC ha modificado el sistema de estadificación TNM para el cáncer de colon para que refleje más exactamente los factores pronósticos. Por ejemplo, a diferencia de la mayoría de los tumores, el tamaño tumoral en el cáncer de colon no influye por sí mismo en el riesgo del paciente que presenta enfermedad recurrente. El nuevo sistema de estadificación TNM pone un mayor énfasis en el número de ganglios linfáticos afectados. El estadio anatomopatológico permite estimar mejor el pronóstico. Actualmente, el estadio "N" o ganglionar se basa en la evaluación macroscópica e histológica estándar. Se considera la presencia de micrometástasis ( $\leq 0,2\text{mm}$ ), pero no se conoce su significación. De forma similar, aunque se dispone de nuevas técnicas para detectar metástasis ocultas mediante inmunohistoquímica y PCR, su significado para determinar el pronóstico aún debe ser evaluado. Cuando se dispone de estos hallazgos en un paciente, se señalan en el informe anatomopatológico, pero se clasifica como N0.

Las nuevas técnicas anatomopatológicas permiten la identificación de un pequeño número de células cancerosas en los ganglios linfáticos que no son evidentes mediante la histología convencional.

La afectación M1 refleja la presencia del tumor en otros órganos del cuerpo, siembra peritoneal, citología positiva en el líquido peritoneal y células tumorales en la médula ósea. El estadio TNM tiene un importante valor pronóstico, se observan diferencias significativas en la supervivencia a 5 años en los pacientes con distintos estadios TNM. Los pacientes con estadio TNM 0, I y II muestran supervivencias a los 5 años superiores al 70%, mientras que los pacientes en estadio IV presentan una supervivencia a los 5 años inferior al 3%.

**Tabla 1.3.4.- Sistema TNM del estadio en el CCR.**

<b>Tumor primario (T)</b>	
TX	Tumor que no puede valorarse
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor que invade la submucosa
T2	Tumor que invade la <i>muscularis propia</i>
T3	Tumor que invade serosa o grasa perirrectal
T4	Tumor que invade otros órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo visceral
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden valorarse
N0	Sin afectación ganglionar
N1	1 a 3 ganglios afectados
N2	4 o más ganglios afectados.
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
MX	Metástasis no pueden ser valoradas
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia presentes
<b>Estadificación por ultrasonidos</b>	
uT0	Tumor benigno
uT1	Invasión pero sin perforar submucosa
uT2	Invasión pero sin perforar <i>muscularis propia</i>
uT3	Invasión a grasa
uT4	Invasión a órganos adyacentes
uN0	Sin afectación a ganglios linfáticos perirrectales
uN1	Metástasis a ganglios linfáticos perirrectales
<b>Estadificación</b>	
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio 1	T1 N0 M0
	T2 N0 M0
Estadio 2	T3 N0 M0
	T4 N0 M0
Estadio 3	T Cualquiera N1 M0
	T Cualquiera N2 M0
Estadio 4	T Cualquiera N Cualquiera M1

### 1.3.5.- Carcinogénesis

El pólipo adenomatoso o adenoma, es considerado generalmente la lesión precursora del CCR <sup>65</sup>. La teoría de que el progreso adenoma a carcinoma, secuencia adenoma-carcinoma, se apoya en el hecho de que las poblaciones con una prevalencia alta de adenomas experimentan una elevada frecuencia de CCR, cuando el CCR se identifica en una etapa precoz, existe gran tejido adenomatoso adyacente, y por último la detección y eliminación del desarrollo de adenomas reduce la probabilidad de CCR <sup>66</sup>. Histológicamente, los adenomas se clasifican como tubulares, túbulo-velloso y vellosos. La mayoría de adenomas de colon comienzan como adenomas tubulares. A medida que crecen, las mutaciones pueden llevar a desarrollar adenomas con focos de displasia o cambios vellosos y, cuando el componente velloso predomina, se denominan adenomas túbulo-vellosos. El riesgo de carcinoma está directamente relacionado con la presencia de cambios vellosos <sup>67</sup>

La mayoría de las neoplasias malignas colorrectales se desarrollan a partir de pólipos adenomatosos preexistentes. Diversos estudios han demostrado que la probabilidad de transformación maligna está relacionada directamente con el tamaño del pólipo, la proporción del componente velloso y la presencia de displasia <sup>68</sup>.

El proceso de transformación de adenomas a carcinomas tiene lugar en un largo período de tiempo, estimado entre siete y diez años, dependiendo del tamaño del adenoma. Por lo tanto, el riesgo de focos displasia de alto grado, o carcinoma, es directamente proporcional al tamaño del adenoma. Este riesgo se estima en menos del 1% para los pólipos menores de 1 cm de tamaño, 10% para los pólipos de entre 1 y 2 cm de tamaño, y más de 25% para los pólipos de más de 2 cm de tamaño. Los pólipos malignos crecen más rápido que los pólipos benignos. La resección de pólipos de tamaño grande e intermedio, disminuye la frecuencia de padecer cáncer colorrectal. Por lo tanto, gran parte del esfuerzo empleado en el cribado de cáncer colorrectal depende en la identificación de adenomas avanzados, la gran mayoría de los cuales son de 1 cm o más de diámetro <sup>23</sup>.

Una vez que una célula se convierte en célula tumoral, la composición y el comportamiento de su progenie no permanecen estáticos, tienden al aumento de su malignidad. Esta se manifiesta por incremento anormal de los cariotipos, aumento de las velocidades de crecimiento e incremento de la tendencia a invadir y formar metástasis <sup>69</sup>.

Al parecer, el importante fenómeno de progresión refleja una inestabilidad fundamental del genoma de las células tumorales, donde, parece probable que las mutaciones en los genes de reparación del DNA participan en este fenómeno mediante la creación de un fenotipo mutador <sup>70</sup>.

En las últimas dos décadas, se ha experimentado un tremendo avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la patogénesis, viendo los procesos anteriormente descritos se han establecido dos vías significativas en el desarrollo del CCR:

**Vía supresora** (Inestabilidad Cromosómica): involucrada en la activación de oncogenes y en la inactivación de genes supresores de tumores, responsable de la mayoría de las formas de cáncer colorrectal esporádico. El factor presumible de iniciación sería la pérdida del gen supresor APC, con la inhibición de genes supresores (DCC, P53) y la activación de oncogenes (k-ras) <sup>71</sup>.

**Vía mutadora** (Inestabilidad de Microsatélites): en la cual el sistema MMR está alterado, dejando errores de replicación en las células tumorales. En primer lugar, como sucede en el síndrome de Lynch, cuya base molecular sería debida a mutaciones a nivel germinal del sistema MMR. En segundo lugar, el que engloba los casos esporádicos, debidos a la metilación del promotor de MMR <sup>72</sup>.

No obstante, se está comenzando a hablar de una tercera vía, denominada **vía “Serrada”** o fenotipo metilador, que englobaría CCR del tipo esporádico y hereditario. Cuyo mecanismo se basaría fundamentalmente en la inactivación transcripcional de regiones promotoras de genes supresores de tumores. Su nombre se debe a la lesión

precursora de morfología serrada, con histología que engloba pólipos hiperplásicos, serrados y sésiles y adenomas serrados <sup>73, 74</sup>.

La caracterización de las alteraciones moleculares en el cáncer colorrectal permite plantear la tipificación de marcadores biológicos y genéticos que permitan predecir el pronóstico. Esta identificación se basaría en el conocimiento en puntos clave para la génesis y progresión del tumor.

#### **1.4.- ESTUDIO IHQ DE MARCADORES**

Es importante distinguir los perfiles bioquímicos de las células recién transformadas, de aquellas células tumorales altamente malignas de crecimiento rápido, cuyos mecanismos principales son: Deficiencias del sistema reparador de falsos emparejamientos con acumulación de alteraciones en el ADN, mutaciones en los reguladores del ciclo celular, progresión mediante la expresión aberrante de factores de crecimiento y sus receptores y por último la metástasis tumoral.

##### **1.4.1.- Deficiencias en el sistema reparador de falsos emparejamientos con acumulación de alteraciones en el ADN**

La acumulación de alteraciones debidas al fallo en los sistemas de reparación de falsos emparejamientos es la causante de la acumulación de mutaciones distribuidas al azar en secuencias repetitivas del DNA (microsatélites), conocida como inestabilidad de microsatélites (MSI). Los tumores MMP+ (*Microsatellite Mutator Phenotype*), tumores que siguen la vía mutadora, y MMP-, tumores que siguen la vía supresora, presentan características clínicas e histopatológicas diferentes. De esta forma, tumores esporádicos de colon con inestabilidad de microsatélites parecen tener localización preferencial en el colon derecho o proximal, contenido celular mucinoso y poca diferenciación histológica <sup>75</sup>.

**MMR** (Mismatch reparation): MLH-1, MSH-2.

La marca distintiva de la deficiencia del sistema de reparación de pérdidas (MMR) es la alta frecuencia de inestabilidad en microsatélites (MSI-H). Se ha demostrado que el 95% de tumores MSI-H muestran pérdida de expresión de las proteínas MLH-1 y MSH-2 y comúnmente deficiencia en alteraciones del gen p53 <sup>76</sup>. La inestabilidad está presente en un 10-15% de tumores de colon esporádicos <sup>77</sup>.

MLH-1 es un componente del sistema MMR, el cual permite la extracción base-base por mal emparejamiento y el bucle inserción-delección que ocurre durante la replicación, la recombinación y los daños en el ADN <sup>78</sup>. Defectos en este gen conducen a la acumulación de errores de replicación y predispone a padecer cáncer colorrectal hereditario no polipósico. La respuesta celular a daños en el ADN requiere la activación de MLH-1, el cual puede cooperar con el gen supresor de tumores p53, promoviendo la detención del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis <sup>79</sup>. Algunos agentes carcinógenos pueden conducir a una vía alternativa apoptótica, en este caso MLH-1 activa c-Abcl tirosín quinasa, la cual puede estabilizar o fosforilar p53 y p73, dependiendo del daño producido en el ADN. Las vías diferentes primadas por p53 y p73 parecen estar asociadas estrechamente con el sistema MMR <sup>80</sup>.

MSH-2 y MSH-6 pueden reconocer específicamente distintos tipos de daños en el ADN, como los causados por agentes oxidantes o alcalinizantes. Se ha descrito con anterioridad que los tejidos son susceptibles a malignizarse si han ocurrido daños en el sistema reparador MMR. Las células afectadas no iniciarían correctamente la apoptosis en respuesta al daño, avanzando hacia una transformación selectiva <sup>81</sup>.

Las proteínas MLH-1 y MSH-2 parecen ser factores críticos para determinar si la célula dañada entra en una de las dos vías que conducen a la inducción de la mutación o a la muerte celular. Por lo que parece un punto de inflexión en la promoción de células tumorales.

#### **1.4.2.- Mutaciones en los reguladores del ciclo celular**

**p73** (Mecanismo regulador de la apoptosis).

El gen p73 codifica una proteína que contiene dos polipéptidos distintos,  $\alpha$  y  $\beta$ . La estructura de la proteína es altamente homogénea a p53 y se enrola dentro de su familia, conservando muchas funciones en común, tales como la activación de la transcripción de otros genes, inhibición del crecimiento celular, senescencia y apoptosis<sup>82</sup>; indicando que p73 es un supresor de tumores parecido a p53<sup>83</sup>.

p73 se expresa monoalélicamente en condiciones normales, aunque su gen mapea en el cromosoma 1p36.33, una región que sufre con frecuencia pérdida de heterocigosidad (LOH) en varios cánceres humanos<sup>84</sup>. La expresión aberrante de p73, debido a la activación de un alelo silente de p73, se ha observado en varios tipos de tumores, incluyendo el CCR, contribuyendo a la progresión de la enfermedad<sup>85, 86</sup>. Se especula que la sobreexpresión de este alelo silente puede deberse a la mutación de p53, muy frecuente en el CCR<sup>87</sup>.

p73 parece tener otro rol adicional en la carcinogénesis, operando como un oncogén y participando en la modulación de la formación de microvasos, regulando la angiogénesis. Cuando p73 se sobreexpresa, los niveles de VEGF aumentan y los niveles de trombospandina-1 disminuyen, lo que sugiere que p73 juega un papel importante en la patogénesis del CCR, especialmente en la angiogénesis<sup>88</sup>.

#### **1.4.3.- Progresión mediante la expresión aberrante de factores de crecimiento y sus receptores**

Los factores de crecimiento causan una respuesta mitógena en sus células blanco, debiendo transmitir un mensaje a través de la membrana plasmática al interior de la célula. El mensaje afecta en última instancia a uno o más procesos de la división celular. La mayor parte de los factores tienen receptores proteínicos de elevada afinidad en la membrana plasmática de las células blanco.



### **IGF-1R** (Receptor de la IGF-1).

IGF-1R es una glicoproteína transmembrana de 350 kDa. El receptor es un heterotetrámero con actividad tirosín-quinasa, compuesto por dos subunidades extracelulares ( $\alpha$ ) que tienen el sitio de unión con el ligando (135 kDa), y dos subunidades ( $\beta$ ) intracelulares (90 kDa) con la actividad tirosín-quinasa. Estas subunidades están conectadas por puentes disulfuro. El dominio quinasa muestra una homología del 84% con el receptor de Insulina. La unión de IGF-1 con su receptor conduce a la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  y a la fosforilación de algunos sustratos citoplasmáticos. El gen que codifica IGF-1R mapea en 15q25-q26 próximo al oncogén *fes*<sup>89</sup>.

IGF-1 tiene una estructura homóloga a la insulina y tiene un número de funciones biológicas similares, tales como mitogénesis, factor de supervivencia anti-apoptótica, metabolismo de la glucosa y los aminoácidos y promoción de la migración celular<sup>90</sup>. Sus efectos son mediados fundamentalmente por la vía de su receptor IGF-1R<sup>91, 92</sup>. Algunos autores indican que el número de receptores de IGF en la membrana de las células, es crítico para el desarrollo de un fenotipo maligno, protegiendo a éstas frente a la inducción de la apoptosis<sup>93</sup>

IGF-1 y su receptor son importantes mediadores en enfermedades inflamatorias crónicas y EII<sup>94-96</sup>, se ha visto importantes aumentos de la presencia en éste tipo de patologías y se ha asociado con un incremento del infiltrado inmunoinflamatorio en la pared intestinal. La intensificación de la expresión en la lámina propia debe contribuir al mantenimiento de la inflamación<sup>94</sup>, ambiente propicio para la promoción de células tumorales.

Se ha observado un aumento paulatino de la presencia de IGF-1R en las células de la cripta, durante la transición desde la mucosa normal del intestino hasta el CCR, pasando por el adenoma<sup>97</sup>, siendo una alteración molecular adicional que ocurre durante la progresión del cáncer colorrectal. IGF1-R induce una cascada intracelular de fosforilaciones que culminan en la activación de factores de transcripción, jugando un

papel en la transformación, mantenimiento, invasión tumoral y metástasis en el CCR determinando un fenotipo agresivo de CCR <sup>98</sup>.

#### **1.4.4.- Promoción y metástasis**

**VEGF** (Factor de crecimiento endotelial vascular).

VEGF es una glicoproteína dimérica sintetizada por células normales y tumorales <sup>99</sup>. Es el mayor responsable de la síntesis de nuevos capilares y la subsecuente diferenciación en vénulas o arteriolas, que pueden extenderse, en un proceso llamado angiogénesis <sup>100</sup>. La angiogénesis es un paso importante en la promoción de la enfermedad, siendo el resultado del balance entre factores estimulantes e inhibitorios y una fuente clave en la diseminación hematógica y metástasis en el CCR <sup>101</sup>. Muchos factores angiogénicos han sido caracterizados, pero quizás VEGF sea el más importante en la mayoría de cánceres humanos, y su expresión puede reflejar la progresión del CCR <sup>102</sup>.

La expresión celular de VEGF es modulada por mediadores y factores de crecimiento por vía endocrina y paracrina <sup>103-105</sup>, asimismo la hipoxia es un potente estimulador de la transcripción de VEGF y sus receptores <sup>106</sup>, por lo que la regulación de la expresión de VEGF se asocia a la inflamación crónica.

Al mismo tiempo se ha conseguido relacionar este factor con efectos mitogénicos en células no epiteliales <sup>107</sup>, lo que daría una importante función paralela a este agente como factor de crecimiento autocrino que induce la progresión de células tumorales.

**COX-2** (Ciclooxigenasa 2).

La COX-2 es una enzima inducible de 70 kDa, responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, precursor común de todos los prostoides, en el lugar de la inflamación <sup>108</sup>.

A diferencia de la COX-1, su expresión en el tejido sano no es constitutiva, depende de la manifestación de diversos estímulos, como la presencia de lipopolisacáridos, interleuquina-1 <sup>109</sup>, factor de crecimiento epidérmico <sup>110</sup>, factores activadores de plaquetas <sup>111</sup> y ácido araquidónico, todos factores relacionados con la inflamación y el

estrés celular. De cualquier forma, la inducción es transitoria, regresando a sus niveles basales dentro de las 24-48 horas. Sin embargo, cuando la inflamación es crónica, los niveles de esta enzima se mantienen en el tiempo y con ello sus efectos, por lo que la isoforma COX-2, se ha postulado como un regulador positivo del componente epitelial de muchas enfermedades <sup>58</sup>, particularmente en el tracto gastrointestinal <sup>112</sup>. Ha mostrado tener un papel importante en la carcinogénesis mediante la estimulación de la proliferación celular epitelial, inhibición de la apoptosis, estimulación de la angiogénesis, potenciación de la invasividad celular y el potencial metastásico, mediación de la supresión inmunológica y el incremento de componentes mutágenos. Se ha visto un incremento de sus niveles de expresión desde la mucosa normal, pasando por los adenomas, hasta el CCR <sup>113</sup>.

Por lo tanto COX-2 se ha relacionado con la oncogénesis y el aumento del potencial metastásico en muchos tipos de cáncer, incluido el CCR.

#### **1.4.5.- Índice de Proliferación Celular**

Ki-67 es una proteína nuclear útil para detectar células proliferativas. Aunque los métodos de citometría de flujo muestran que está presente en todas las fases del ciclo celular (G1, G2 y S), pero no en las células en fase G0 (quiescentes); su detección por métodos de IHQ se limita a fase tardía G1 con máxima expresión en profases y metafases, y sus niveles son aparentemente indetectables durante la interfase. Por esta razón, Ki-67 se reconoce como un indicador de actividad mitótica y proliferativa <sup>114</sup>.

El índice de proliferación es conocido como un instrumento para la valoración de las neoplasias, relacionado con la oncogénesis y progresión del tumor, reflejando el curso de la enfermedad <sup>115</sup>.

Es de fácil evaluación en muestras tumorales resecadas y se ha utilizado en muchos estudios en la estimación pronóstica de los pacientes <sup>116-118</sup>.

#### **1.4.6.- Infiltrado linfocitario tumoral**

Numerosas evidencias sugieren que la progresión del tumor no sólo estriba en cambios genéticos intrínsecos, sino que también hay una dependencia de factores ambientales y epigenéticos <sup>119</sup>. La inflamación con la correspondiente infiltración linfocitaria peritumoral indica una respuesta inmunológica a la invasión. Es un fenómeno común en tumores malignos, las células tumorales producen varias citoquinas que atraen a los leucocitos a la zonas invasivas <sup>120</sup>.

El componente inflamatorio está compuesto por una población heterogénea de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos, capaces de producir una serie de mediadores y compuestos químicos, tales como especies reactivas de oxígenos, proteasas extracelulares, metaloproteasas, agentes perforadores de membrana y factores pro-angiogénicos, con grandes efectos en la promoción de la neoplasia <sup>121, 122</sup>.

El componente inflamatorio actúa mediante una relación "simbiótica" con las células tumorales, produciendo citoquinas que facilitan la inestabilidad genómica, la migración, la supervivencia y la diferenciación de todas las células en el microambiente tumoral <sup>123</sup>.

Actualmente la inflamación crónica se considera la séptima característica del cáncer <sup>124</sup>, la respuesta inflamatoria al tumor se ha establecido como un factor pronóstico independiente en el CCR <sup>125, 126</sup>. En conjunto, el tipo, densidad y la ubicación del infiltrado inflamatorio parece ser un factor relacionado a la recurrencia y la supervivencia en pacientes con CCR <sup>127</sup>.

## **II.- JUSTIFICACIÓN**



## **2.1.- HIPÓTESIS**

La asociación entre obstrucción intestinal y estadio avanzado de la enfermedad hace pensar que los procesos de crecimiento, supervivencia celular y angiogénesis están implicados en tumores colorrectales que se comportan de forma estenosante. El desarrollo de estenosis en neoplasias de colon y recto, debe verse reflejado en un patrón diferente de expresión de factores que promuevan el crecimiento celular asociado al cáncer.

Cualquier proceso aberrante asociado con esta regulación tendrá un impacto potencial en la carcinogénesis y en la historia natural de la enfermedad. Por ello, iniciamos la búsqueda de elementos asociados, que deben tener un valor pronóstico en relación a la recidiva de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.





## **2.2.- OBJETIVOS**

### **2.2.1.- Objetivo principal**

Determinar y cuantificar la expresión de MMR (MLH-1, MSH-2), VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 e índice de proliferación celular (Ki-67) en el CCR (Cáncer Colorrectal), mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Relacionar esta manifestación con el debut de la neoplasia: Cáncer Colorrectal Estenosante (CCE) y Cáncer Colorrectal No Estenosante (CCNE).

### **2.2.2.- Objetivos secundarios**

- Valorar si la expresión de IGF-1R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2, VEGF y Ki-67 está asociada con el sexo y edad de los pacientes.
- Evaluar la relación entre la expresión de IGF-1R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2, VEGF y Ki-67 y el grado de diferenciación histológico, la localización y el tamaño tumoral.
- Estimar si la expresión de IGF-1R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2, VEGF y Ki-67 está asociado a la extensión tumoral.
- Analizar si existe un patrón que relacione la expresión de IGF-1R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), COX-2, VEGF y Ki-67 con los valores de CEA de los pacientes.
- Relacionar la expresión de estos marcadores con el pronóstico vital del paciente. Determinar factores pronósticos independientes de la recidiva y supervivencia de los enfermos.
- Averiguar el grado de coexpresión de las distintas proteínas en la neoplasia primaria.
- Demostrar que la cuantificación de las distintas IHQ por los métodos tradicionales y de análisis de imagen son válidos y comparables.



### **III.- MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio analítico-descriptivo, observacional y retrospectivo, sobre serie de pacientes afectos de cáncer colorrectal, con un tiempo de seguimiento de 5 años.

### **3.2.- SUJETOS Y GRUPOS DE ESTUDIO**

Los pacientes fueron divididos en grupos según presentaran o no obstrucción intestinal en el momento del debut de la neoplasia.

La obstrucción se definió como la ausencia total de gases o movimientos intestinales, acompañado de signos de obstrucción clínica (distensión abdominal y vómitos) o evidencia radiográfica (dilatación de las asas del intestino) y/o aquellos que el informe de anatomía patológica definió como estenosantes. La obstrucción pudo ser parcial o completa.

A: Pacientes con CCE (Cáncer Colorrectal Estenosante).

B: Pacientes con CCNE (Cáncer Colorrectal No Estenosante).

### **3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Los sujetos fueron seleccionados de forma aleatoria de entre aquellos pacientes intervenidos de cáncer colorrectal por la unidad de cirugía de urgencias de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (Sevilla), usando para ello la base de datos gestionada por dicha unidad.

En la selección se tuvo en cuenta la evolución de la enfermedad, para ello se reclutaron pacientes intervenidos cinco años antes de la fecha límite del estudio retrospectivo.

Se excluyeron aquellos pacientes que en el momento del diagnóstico presentaron neoplasias sincrónicas o fallecieron por complicaciones asociadas a la cirugía y/o

aquellos cuya intención quirúrgica fue de tipo paliativo. También se excluyeron aquellos pacientes carentes de muestras tisulares en el servicio de anatomía patológica de los H.H.U.U. Virgen del Rocío, bien por inexistencia de pieza operatoria, bien por existencia de la misma en un hospital ajeno a los H.H.U.U. Virgen del Rocío. Además se excluyó a los sujetos que continuaron el manejo diagnóstico-terapéutico de la patología en otro hospital.

### **3.4.- JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL**

Aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,20 en un contraste unilateral, se precisan 31 sujetos en el primer grupo (CCE) y 31 en el segundo (CCNE) para detectar una diferencia igual o superior al 0,25 entre ambos. Se asume una proporción del 0,67 en uno de los grupos <sup>128</sup>.

Asumiendo una proporción de pérdida del 15% (entre 10-20% para enfermedades graves), debido a los criterios de exclusión anteriormente expuestos, escogimos un tamaño muestral inicial (n=100) que nos garantizó compensar las salidas del estudio y mostrar diferencias entre grupos sin llegar a conclusiones erróneas.

### **3.5.- BÚSQUEDA Y REVISIÓN DE HISTORIAS CLÍNICAS**

Centro de documentación clínica de los HHUU Virgen del Rocío.

Tras la selección de pacientes e identificando su historial clínico, procedimos a la revisión de los historiales, recogiendo los datos reflejados en el cuaderno de recogida de datos (Anexo I), dividido en varios apartados:

Encabezando la hoja encontramos dos ítems que clasifican el tipo de tumor del paciente en carcinoma colorrectal estenosante (CCE) o carcinoma colorrectal no estenosante (CCNE), así como el número asignado al paciente en el estudio.

Un primer apartado refleja los datos de filiación del paciente, incluyendo el número de biopsia correspondiente a la pieza operatoria que incluya el tumor, que fue necesario para la localización de los cortes histológicos en el servicio de anatomía patológica.

Un segundo apartado incluye la localización tumoral, los datos referentes a la intervención quirúrgica, tratamiento coadyuvante recibido y datos anatomopatológicos necesarios para la estadificación de la neoplasia.

El tercer apartado recoge los datos clínicos y analíticos del paciente. En el cuarto apartado se recogen los datos referentes al seguimiento del paciente. En el último apartado se reflejan los datos inmunohistoquímicos.

Todos los datos recogidos fueron almacenados en soporte informático a través de un archivo .xls (Microsoft Excel) y posteriormente codificados para su análisis.

### **3.6.- VARIABLES**

Se registraron los siguientes datos y variables para cada paciente:

#### **3.6.1.- Características demográficas**

- Edad: Edad, en años, del paciente en el momento del diagnóstico. Es decir, la fecha de la anamnesis y exploración física completa, que consta en la historia clínica.

Para el estudio estadístico posterior, se categorizó en dos grupos, los menores a 65 años, y aquellos cuya edad fue igual o superior a 65 años.

Se calculó la media de edad así como la desviación típica de la misma, para la muestra total, así como para los distintos grupos.

- Sexo: Hombre, Mujer.

#### **3.6.2.- Características clínicas y variables relativas a la forma de presentación de la enfermedad**

- Oclusión: Variable observada en el momento del diagnóstico, completa, incompleta.

- Suboclusión: Variable observada en el momento del diagnóstico, presencia, ausencia.
- Rectorragias: Variable observada en el momento del diagnóstico, presencia, ausencia.
- Melenas: Variable observada en el momento del diagnóstico, presencia, ausencia.
- Dolor y distensión abdominal: Variable observada en el momento del diagnóstico, presencia, ausencia.
- Localización del tumor: Localización anatómica de la neoplasia primaria, distribuidas en ciego, colon derecho, transverso, izquierdo, sigma y recto.
- Clasificación TNM: Clasificación del estadio clínico basado en el sistema tumor-linfonodo-metástasis (AJCC). Dividido en los estadios I; II; III; IV.
- Localización de las metástasis: Se hizo constar los órganos o estructuras anatómicas afectadas, sin extendernos en subestructuras concretas, ni especificar si la afectación metastásica era única o múltiple. Por lo que la variable proporciona la localización metastásica dominante: Hígado, Pulmón, Óseas, Cerebrales.
- CEA preoperatorio: Valores del marcador tumoral, antígeno carcinoembrionario en el ámbito preoperatorio. Se consideraron valores normales aquellos cuya concentración en sangre fue  $<5 \mu\text{g/l}$ , y valores anormales los que superaron este nivel  $\geq 5 \mu\text{g/l}$ .

### **3.6.3.- Características histopatológicas del tumor**

- Tamaño tumoral: Diámetro máximo en superficie, expresada en centímetros, del tumor primario.
- Grado de diferenciación: Bien diferenciado, moderadamente diferenciado o pobremente diferenciado. Posteriormente se reclasificaron en dos categorías, más acordes a las nuevas publicaciones y guías clínicas, agrupándose las categorías bien y moderadamente diferenciado.



- Existencia de infiltrado linfocitario: Celularidad inflamatoria, con presencia de linfocitos y macrófagos, afectando al componente glandular y/o estroma. Presencia, ausencia.
- Microlocalización del infiltrado linfocitario: Presencia de infiltrado linfo-plasmocitario, con existencia de leucocitos, mastocitos e histiocitos, en el margen de crecimiento o frecuentes cúmulos linfocitarios perivasculares.
- Expresión de: IGF1-R, p73, MMR (MLH-1, MSH-2), VEGF y COX-2. Cuantificación de la expresión.
- Índice de proliferación celular (Ki-67): Porcentaje de células Ki-67(+) respecto a células tumorales totales.

#### **3.6.4.- Seguimiento oncológico**

- CEA postoperatorio: Valores del marcador tumoral, antígeno carcinoembrionario en el seguimiento de la enfermedad.
- Tratamiento adyuvante: Recogida de datos referentes al tratamiento recibido, localizados o sistémicos, por cada paciente una vez finalizado el estudio diagnóstico: Quimioterapia, Radioterapia, Quimioterapia + Radioterapia.
- Periodo libre de enfermedad: Tiempo en meses desde el diagnóstico (cirugía) hasta la recurrencia de la enfermedad (local o sistémica). Las localizaciones anatómicas de las mismas fueron hígado, pulmón, peritoneo, cerebrales y óseas.
- Éxito: Fecha del óbito, si se produjo en el tiempo de estudio. La supervivencia global se midió en meses completos desde el diagnóstico hasta el fallecimiento.

**Tabla 3.6.- Variables del estudio**

<b>Variables</b>
Edad.
Sexo.
Localización tumor.
Clasificación TNM.
Metástasis y localización de las mismas.
Oclusión completa/incompleta.
Suboclusión.
Rectorragias
Melenas.
Dolor.
CEA pre/postoperatorio.
Tamaño tumoral en cm.
Grado de diferenciación.
Existencia de infiltrado linfocitario.
Microlocalización de infiltrado linfocitario.
Expresión de: IGF1-R, p73, MMR (MLH1, MSH2), VEGF y COX-2.
Proliferación celular (Ki-67).
Tratamiento adyuvante.
Periodo libre de la enfermedad.
Recidiva y su localización.
Éxito.

### **3.7.- REGISTRO Y RECOGIDA DE MUESTRAS TUMORALES**

Banco de tumores de los HHUU Virgen del Rocío (Servicio de Anatomía Patológica).

En el Servicio de Anatomía Patológica de los HH.UU. Virgen del Rocío se almacenaron muestras de cada biopsia operatoria divididas en bloques. Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología rutinaria del laboratorio de diagnóstico anatomopatológico.

Cotejando el número de historia de cada paciente, se identificó los correspondientes bloques de biopsia para el estudio. De cada bloque se realizó un corte de 5 µm mediante micrótopo (Leica RM2125 RTS) y la posterior tinción con hematoxilina-eosina. Esta tinción es uno de los métodos más utilizado en histología y medicina diagnóstica. Es característica por teñir en tono azul los núcleos celulares (hematoxilina) y por teñir los componentes citoplasmáticos de rojo-rosa (eosina). La técnica requiere una desparafinización y rehidratación del tejido, pasándolo por xilol y una batería de alcoholes a nivel decreciente de concentración. Una vez lavado el exceso de alcohol, sumergimos el tejido en hematoxilina hasta apreciar coloración, volvimos a lavar e hicimos el mismo proceso con la eosina. Seguidamente se volvió a lavar retirando el excedente de eosina y se deshidrató el tejido, pasándolo por una batería de alcoholes a nivel creciente de concentración. Dejamos la muestra en xilol y se montó con medio de montaje no soluble en agua (Dako Mounting Medium).

Se evaluó el resultado de la tinción bajo microscopio óptico (BX61-Olympus (Olympus Optical Co., Tokyo, Japón); con óptica UPlan FL y cámara refrigerada DP72), y seleccionamos la región más adecuada, es decir, la más representativa de la neoplasia a estudiar. Sólo se escogieron muestras que tuvieron una media del 80% de componente tumoral (células y estroma tumoral), rechazando las zonas con alto contenido necrótico.

Una vez conocido el bloque más distintivo, procedimos al corte en secciones de 5 µm, hasta obtener la cantidad de tejido adecuado para su estudio inmunohistoquímico.

### 3.8.- PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Laboratorio de Histoquímica del Servicio Anatomía Patológica.

Para la obtención de una buena señal en la técnica y evitar falsos positivos, se realizaron distintos ensayos preliminares.

La recuperación de epítipo inducida por calor, varió según el anticuerpo utilizado, adecuando la solución de recuperación a cada circunstancia (EDTA pH 9 o Citrato pH 6 (Dako Diagnósticos, S.A.)).

Las concentraciones óptimas de anticuerpo se corrigieron dependiendo de la muestra y de la señal obtenida en diversas pruebas iniciales. Dichas concentraciones se determinaron individualmente para evitar el efecto *prozone* (inhibición del marcaje debido a impedimentos estéricos).

El tiempo de incubación del anticuerpo primario en el tejido fue de 12-14 horas (incubación *overnight*).

En todos los casos, como control negativo de la técnica, se sustituyó el anticuerpo primario por solución de bloqueo.

### **3.9.- ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO**

Laboratorio de Histoquímica del Servicio de Anatomía Patológica.

Determinación mediante técnicas inmunohistoquímicas de la expresión de MMR (MLH-1, MSH-2), VEGF, COX-2, IGFR, p73, Ki-67, en especímenes neoplásicos de CCE y CCNE tomados *in vivo* en el humano.

#### **3.9.1.- Preparación Cortes**

Se procedió al corte de los tejidos mediante micrótomos común (Leica RM2125 RTS), en secciones de 5 µm y fueron montados en portaobjetos silanizados (Dako silanized slides), estos aumentaron la adherencia histológica a la superficie, evitando el desprendimiento de los tejidos más grasos durante su procesamiento posterior.

Se retiró la parafina embebida en cubetas de Xilol, y se rehidrató el tejido pasándolo sobre series de alcohol en graduación descendente.

#### **3.9.2.- Desenmascaramiento de epítomos**

Durante la fijación y en los métodos post-inclusión muchos epítomos antigénicos pueden ser destruidos o enmascarados. Los procedimientos que provocan destrucción de epítomos son las condiciones hidrofóbicas y de alta temperatura que sufren las muestras al incluirlas en parafina. Se ha descrito que el tratamiento de secciones desparafinadas con soluciones de EDTA pH 9 (Dako Diagnósticos, S.A.) o Citrato pH 6 (Dako Diagnósticos, S.A.) a altas temperaturas, desenmascara epítomos antigénicos. Otra estrategia que funciona en ocasiones es el tratamiento del corte con enzimas proteolíticas: tripsina, pepsina, quimotripsina y pronasa.

### **3.9.3.- Saturación de peroxidasas endógenas**

La eliminación de la actividad peroxidasa endógena sólo es necesaria cuando se emplea peroxidasa (HRP) como marcador. Se consigue incubando los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno (0,3-3%) (Sigma-Aldrich Co. LLC.) de 10 a 30 minutos. De este modo se bloquea la actividad peroxidasa de las células, salvo de las células sanguíneas (descrito en limitaciones de la técnica).

### **3.9.4.- Bloqueo de uniones inespecíficas**

Este paso tiene la doble función de bloquear los radicales libres reactivos presentes en el tejido de manera natural o introducidos como consecuencia de la fijación, generalmente de tipo aldehído, y saturar las uniones de los anticuerpos con proteínas. Se utilizó albúmina sérica porcina (Sigma-Aldrich Co. LLC.), con una concentración elevada (1-10%) de suero preinmune, en una solución de PBS (Dako Diagnósticos, S.A.) y Tritón 100-X (0,1%) (Sigma-Aldrich Co. LLC.).

### **3.9.5.- Incubación con el anticuerpo primario**

Los anticuerpos primarios puede ser monoclonales en cultivo o líquido ascítico, anticuerpos monoclonales o policlonales purificados y antisueros policlonales. Es aconsejable la purificación de las IgG, con proteína  $\alpha$ -Sepharosa, o por afinidad con el antígeno, ya que eliminan enzimas séricos y proteínas que pueden producir inespecificidad, por ejemplo la  $\alpha$ -Macroglobulina. Sin embargo esto no siempre es posible debido a las pequeñas cantidades de anticuerpo disponibles. El antisuero policlonal es frecuentemente una fuente importante de contaminantes, bien debido a las fuentes del antígeno o a las condiciones del animal inmunizado. Una estrategia que permite la eliminación de estos contaminantes es la absorción del antisuero con polvo acetónico de tejidos que no presenten el antígeno.

## Composición del medio de incubación.

El medio de incubación del anticuerpo primario fue tampón fosfato (0,1-0,15 M, pH 7). Se añadió NaCl a una concentración 0,154 M (0,9%) para reducir los enlaces inespecíficos producidos por fuerzas iónicas y hidrofílicas presentes en el tejido. Adjuntamos a la mezcla, albúmina de suero porcino preimmune (1-10%), que además de competir con el anticuerpo primario por los lugares inespecíficos de unión del tejido disminuyó la adherencia del anticuerpo al vidrio. Además se añadió, salvo contraindicación expresa, cantidades moderadas de Tritón X-100 (0,1-0,3%) y de acida sódica (0,05-0,1%) (Sigma-Aldrich Co. LLC.). El detergente redujo las uniones inespecíficas además de permeabilizar el tejido. La acida sódica retardó el crecimiento bacteriano, siendo necesario en las incubaciones largas, superiores a 6 horas.

## Diluciones, tiempo de incubación y eficiencia de detección.

La dilución de anticuerpo a emplear es un aspecto fundamental en la secuencia inmunohistoquímica. Las diluciones han de ser lo más elevadas posible, pero sin incrementar el marcaje inespecífico. Cuando la concentración es muy elevada se une demasiado anticuerpo inespecíficamente aumentando el ruido de fondo (*background*). Cuando la concentración es muy baja la señal es demasiado débil. Con anticuerpos puros como los monoclonales el margen de uso oscila entre 1 y 25 µg/ml. En el caso de antisueros, líquido ascítico y preparaciones de IgG completas la dilución es necesario establecerla experimentalmente y es una característica que depende tanto de la concentración del anticuerpo, como del antígeno en la muestra. Hay una fuerte correlación entre la concentración del anticuerpo, su afinidad y la concentración de antígeno. Con un antígeno abundante y en áreas localizadas, el anticuerpo ha de estar muy diluido, y siempre un anticuerpo de baja a media afinidad puede provocar una reacción intensa. Sin embargo, cuando el antígeno se encuentra

en concentraciones bajas el anticuerpo ha de estar más concentrado y un anticuerpo con una avidéz media a baja, como los purificados por afinidad, puede no detectarlo claramente.

Otro factor de gran importancia, con implicaciones sobre la dilución, la eficiencia en la detección y la sensibilidad de los protocolos inmunohistoquímicos es el tiempo de incubación con el anticuerpo y la temperatura. El anticuerpo primario puede estar en contacto con la muestra entre 1 y 72 horas, dependiendo del grosor de los cortes, el grado de permeabilización, el título del anticuerpo y la afinidad. Los efectos beneficiosos del incremento del tiempo en la incubación varían entre los diferentes anticuerpos, pero en algunos casos producen un incremento en el marcaje de cien veces respecto a las incubaciones de tiempo corto. Sin embargo es necesario tener presente que con anticuerpos de baja afinidad los tiempos largos de incubación pueden incrementar el ruido de fondo. Respecto a la temperatura se recomienda trabajar a temperaturas bajas, 4°C, para incubaciones largas mayores a 12 horas, y a temperatura ambiente o 37°C para incubaciones cortas. En cada una de las pruebas que se efectuaron, se utilizó un control positivo de la técnica, que fue un tejido con reactividad conocida con el anticuerpo primario empleado, así como un control negativo de la misma, sustituyendo el anticuerpo primario por solución de bloqueo. Se incubaron las muestras en cámara húmeda a una temperatura de 4° C durante un periodo de 12-14 horas (*overnight*).

Almacenamiento de anticuerpos y de diluciones.

Los anticuerpos no conjugados y los acomplejados pueden mantenerse a 4°C durante algunos meses, si se añade a la solución algún compuesto antibacteriano. Para almacenar estos anticuerpos durante tiempos más prolongados se alicuotaron en cantidades pequeñas y se mantuvieron congelados a una temperatura inferior a -20°C, idealmente a -80°C. De esta forma la actividad se mantiene durante años. Se recomienda en general un almacenamiento a 4°C de los anticuerpos conjugados ya que la congelación puede romper el enlace entre el anticuerpo y el marcador.



Las diluciones de anticuerpo primario y secundario se reutilizaron en diversas incubaciones. El número de veces que puede reutilizarse depende del sistema de almacenamiento y de la concentración del antígeno en el tejido. Entre una incubación y otra, las soluciones se mantuvieron a 4°C en acida sódica (Sigma-Aldrich Co. LLC.). Sin embargo, dado que la concentración de antígeno es difícil de estimar hay que evitar siempre que sea posible la reutilización de las soluciones.

#### **3.9.6.- Incubación complejo secundario**

Tras la incubación de las secciones frente al anticuerpo primario, se procedió al lavado de las mismas con tampón fosfato para retirar el exceso del primario. Los portaobjetos se secaron y se procedió a la incubación del complejo secundario, 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó el tejido con solución fosfato para descartar el exceso de anticuerpo secundario.

#### **3.9.7.- Revelado**

En el revelado se usó 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico (DAB) en un tiempo de exposición que varió entre 3-5 minutos. La señal obtenida se controló usando microscopio óptico convencional. Por último, las muestras se contratiñeron con Hematoxilina (protocolo anteriormente descrito), para visualizar los núcleos de las células, y se montaron con medio de montaje (Dako Mounting Medium).

### **3.9.8.- Limitaciones de la técnica**

El resultado de la tinción de tejidos depende de la manipulación y el procesamiento al que se someta el tejido antes de su tinción. Una técnica incorrecta en el fijado, secado, calentado o seccionado, o la contaminación por contacto con otros tejidos o líquidos, puede producir artefactos o resultados falso-negativos.

La utilización de fijadores antiguos o no tamponados, o la aplicación de calor excesivo durante el procedimiento de inclusión, temperaturas superiores a 60º, pueden suponer una disminución de la sensibilidad.

Puede detectarse actividad de la peroxidasa endógena o pseudoperoxidasa en hemoproteínas como son la hemoglobina, mioglobina, citocromo y catalasa, así como en eosinófilos. Esta actividad puede inhibirse incubando los especímenes con algún bloqueante de la peroxidasa, como soluciones de metanol o de peróxido de hidrógeno, antes de la incubación con el anticuerpo primario. Este procedimiento no anula el pigmento marrón rojizo de las hemoproteínas. Sin embargo, algunos antígenos pueden desnaturalizarse en este proceso.

Es posible que los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y con antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) muestren tinción no específica con peroxidasa.

El suero normal o no inmune de la misma fuente animal que el antisuero secundario utilizado en los pasos bloqueantes puede causar resultados falso-negativos o falso-positivos dada la presencia de auto-anticuerpos o anticuerpos naturales.

### 3.10.- EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN

#### 3.10.1.- Semicuantitativo (*de visu*)

Las preparaciones se evaluaron bajo microscopio óptico (BX61-Olympus (Olympus Optical Co., Tokyo, Japón); con óptica UPlan FL y cámara refrigerada DP72), con el asesoramiento previo de un patólogo. Las imágenes fueron digitalizadas con una resolución de 1360x1024 píxeles bajo luz visible convencional, y se almacenaron como archivos .tif de 16 bits.

Se seleccionaron los diez campos más representativos de cada muestra, identificando las zonas de mayor densidad de células positivas con presencia de células tumorales, acompañadas de fondo inflamatorio propio, evitando focos desvitalizados o con artefacto.

La inmunotinción, para cada uno de los anticuerpos, VEGF, COX-2, p73, IGF-1R, Ki-67, se clasificó según el método tradicional de marcaje histológico, midiendo la intensidad de la expresión (0=Negativo, 1=Pobre, 2=Moderada, 3=Intensa) y la extensión de la misma (0=0%, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100%), ajustando los porcentajes de extensión a las áreas de expresión positiva del carcinoma.

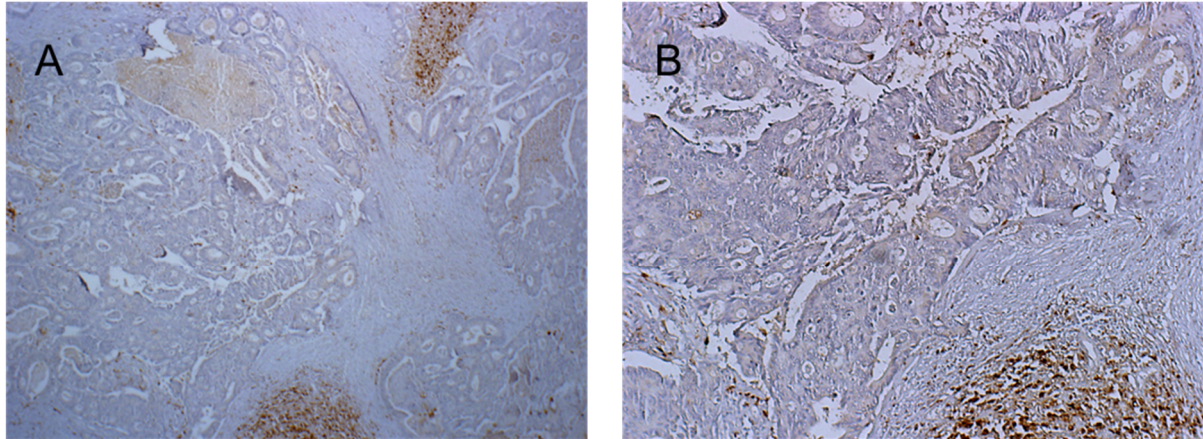
Para la obtención del *score* final, se realizó la suma de la calificación de la intensidad y de la extensión, alcanzando un rango que osciló entre 0-7. Para el análisis estadístico se consideró expresión positiva, aquellos tumores con un *score* final  $\geq 5$  (intensidad  $\geq$  moderada y extensión  $\geq 50\%$ ).

En el caso de la expresión de las proteínas MLH-1 y MSH-2, sólo se valoró la presencia o ausencia de las mismas. Los tumores que mostraron la pérdida de expresión nuclear de estos factores, fueron clasificados como MLH-1 y/o MSH-2 negativos.

La inmunorreactividad de células normales epiteliales, linfocitos y células del estroma sirvieron como controles internos positivos de la técnica.

Al mismo tiempo, la tinción indirecta de estos linfocitos nos sirvió para valorar el infiltrado linfocitario de cada región. La densidad del infiltrado linfocitario se midió prestando especial atención al área central y los márgenes invasivos del tumor (Figura 3.10.1).

**Figura 3.10.1.- Análisis Infiltrado inflamatorio**



Reacción de células inflamatorias en el área invasiva frontal, alrededor de las isletas del tejido tumoral. A. Alto grado de infiltración celular en neoplasia de colon (x40). B. Alto grado de infiltración celular en neoplasia de colon (x100). La inmunorreactividad indirecta aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

La reacción inflamatoria se evaluó de forma tradicional, con un score distribuido en débil, moderado y fuerte, si bien para el análisis estadístico se consideró infiltrado positivo aquellos tumores con un score medio  $\geq$  moderado.

Por último, valoramos el grado de diferenciación del tumor, clasificándolo en grado I o bien diferenciado (>95% del tumor forma glándulas), grado II o moderadamente diferenciado (50-95% del tumor forma glándulas) y grado III o pobremente diferenciado (<50% del tumor forma glándulas). Posteriormente se reclasificaron en dos categorías, diferenciados o indiferenciados, más acordes a las nuevas publicaciones y guías clínicas.

### 3.10.2.- Análisis de Imagen

Para complementar la evaluación, minimizar los errores debido a la subjetividad de la interpretación y aumentar la reproducibilidad de los resultados, empleamos un software para el análisis digital de imágenes, en la cuantificación.

Utilizamos el programa basado en Java “*NIH ImageJ*” (National Institutes of Health, versión 1.49q), más las herramientas específicas “*Color Deconvolution*” (desarrollado por Gabriel Landini, University of Birmingham), “*Cell Counter*” (desarrollado por Kurt De Vos, University of Sheffield) e “*Immunohistochemistry Image Analysis*” (desarrollado por Jie Shu , University of Nottingham).

El software *ImageJ* puede medir la densidad óptica en cada región de una preparación histológica observada al microscopio, determinando cuantitativa y objetivamente la presencia de determinados elementos (proteínas) en el tejido.

Aprovechando las imágenes tomadas para el análisis *de visu*, analizamos el histograma de color de las áreas desocupadas, allí se comprobó si los canales RGB (rojo, verde y azul) eran iguales, en caso negativo, se excluyó el correspondiente fondo, eliminando así cualquier tipo de artefacto.

En el siguiente paso usamos el *plug-in* “*Color Deconvolution*”, este utensilio adquiere imágenes RGB y las transforma en tres imágenes de 8-bit, substrayendo por separado los colores. Las dos primeras imágenes digitalizadas, corresponden a la contratinción con Hematoxilina y la tinción con DAB, la tercera debería ser blanca si se ha sustraído bien el correspondiente fondo (Figura 3.10.2).

Figura 3.10.2.- Análisis cuantitativo de la expresión de Ki-67 en cáncer colorrectal.

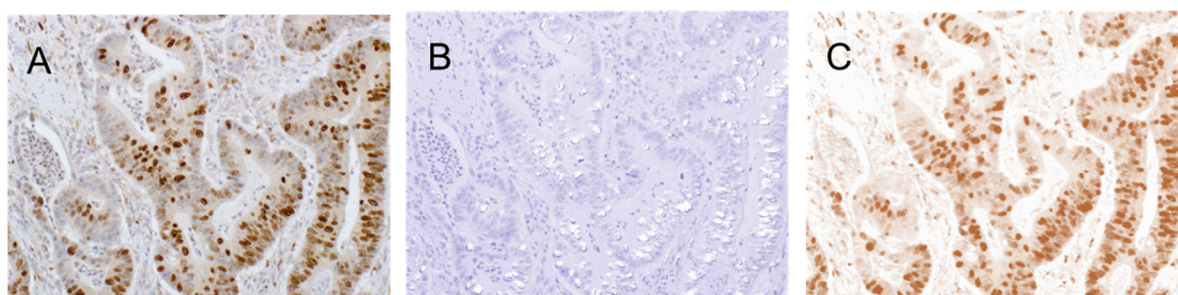


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Apariencia visual RGB de la muestra. B. Señal de Hematoxilina de la muestra sin mezclar. C. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar.

Una vez obtenidas las imágenes separadas, utilizamos la herramienta “*Cell Counter*” para la determinación de la expresión de proteínas nucleares. Este instrumento nos permitió contar manualmente el número total de núcleos, imagen de hematoxilina, así como el número de núcleos DAB positivos. Se usó un máximo de 3 fotografías de las áreas más representativas y realizamos una media del *ratio* que nos sirvió como *score* final.

Para la evaluación de la expresión de p73, y análisis del índice de proliferación celular (IP) (Inmunotinción Ki-67-MIB-1), se calculó la relación porcentual entre células tumorales inmunorreactivas y células tumorales totales. Se utilizó el valor medio porcentual de la evaluación de 3 campos de gran aumento. Aquellos tumores que presentaron un porcentaje por encima de la mediana de la distribución se consideraron como p73(+) y Ki-67(+).

Para la cuantificación de expresión de proteínas que se expresaron en citoplasma y/o membrana, empleamos la herramienta “*Immunohistochemistry Image Analysis*”. Este *plug-in* fue útil para medir el área en mm<sup>2</sup>, la media y mediana de intensidad de DAB, variando desde 0 hasta 255, donde 0 representó el negro, y 255 el blanco total.

El grado de intensidad final de DAB lo calculamos en base a la fórmula  $f=255-i$ , donde “f” es la intensidad final de DAB, e “i” la media de la intensidad de DAB obtenida por el programa. Los valores oscilaron en el rango 0-255, donde 0 representó el blanco y 255 el nivel más alto de intensidad de la expresión.

Utilizamos un máximo de 3 fotografías de las áreas más representativas, e hicimos una media para el *score* final.

### 3.11.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Análisis estadístico de la correlación existente entre la expresión de MMR (MLH-1, MSH-2), VEGF, COX-2, IGFR, p73, Ki-67 y los parámetros clínico-patológicos estudiados.

Para el cálculo de normalidad de los datos de la muestra se usó el test de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar las variables cualitativas según los dos grupos de estudio se utilizó la prueba de la  $X^2$  o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. En el caso de las variables cuantitativas se usó la prueba t-Student o la prueba de análisis de varianza ANOVA. Para los datos cuya distribución no fue normal, utilizamos métodos de análisis no-paramétricos (U de Mann-Whitney).

Se realizó un análisis descriptivo para el resto de variables, calculando la media y desviación estándar para las variables cuantitativas o las frecuencias absolutas y relativas en el caso de variables cualitativas.

Utilizamos el método univariante Kaplan-Meier para estimar la aparición de recidiva local y/o a distancia en función del tiempo y la supervivencia. Se usó el test de rango logarítmico de Mantel-Cox para determinar las diferencias estadísticas en las correspondientes curvas. El intervalo desde la fecha de la resección hasta la fecha del último contacto o del óbito (si el paciente falleció), se usó para el análisis de supervivencia. Las muertes por causa desconocida u otras causas no relacionadas con la enfermedad fueron tratadas como observaciones censuradas.

Utilizamos el método de correlaciones bivariadas, con el correspondiente coeficiente de Pearson, para el estudio de coexpresión de las distintas proteínas.

Para el análisis multivariante de las variables más significativas respecto a la recurrencia y la supervivencia se utilizó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de COX.

Para la predicción de la estenosis en función de los factores estudiados, utilizamos el método de regresión logística binaria, con el correspondiente ajuste de bondad global de Hosmer-Lemeshow.

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa estadístico IBM SPSS *Statistics*, versión 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Fue considerado estadísticamente significativo una  $p < 0,05$ .

### **3.12.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Este estudio presentó algunas limitaciones. En primer lugar, destacar la dificultad para la selección de casos que cumplieran todos los requisitos de inclusión y cuya historia clínica recogiera todos los datos precisos para el mismo, así como disponer de material histológico suficiente de la neoplasia para realizar el estudio inmunohistoquímico posterior. Estas pautas nos obligaron a limitar considerablemente el número de casos estudiados.

No podemos excluir la posibilidad de que la falta de una asociación observada entre los predictores y las variables clínico-patológicas estudiadas, la recurrencia y la supervivencia, puede haber sido el resultado de un error en relación con el tamaño de la muestra.

En segundo lugar, el análisis inmunohistoquímico se basó en el estudio del tejido del tumor primario, y no se realizó un re-examen histopatológico de la recidiva o metástasis. Por tanto, no tuvimos información a nivel molecular en el tiempo, de los predictores potenciales estudiados.

Por último, el tiempo de seguimiento en este análisis fue de 5 años, momento en el cual los pacientes libres de enfermedad fueron remitidos a atención primaria. Cabe la posibilidad de que algunos pacientes fallecieran o presentaran el desarrollo de recurrencias después de este tiempo.



### 3.13.- REACTIVOS

#### 3.13.1.- Anticuerpos primarios

**VEGF** (*Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody*).

BD Biosciences.

Clona: G153-694.

Isotipo: *Mouse IgG2b*, kappa.

Especificidad: El anticuerpo G153-694 marca las 3 isoformas recombinantes, VEGF-121, VEGF-165, y VEGF-189, en experimentos de transferencia *Western-Blotting*. El anticuerpo traza las bandas dobles características observadas cuando VEGF funciona bajo condiciones reducidas. En inmunohistoquímica, el anticuerpo reacciona con la proteína VEGF equivalente en ratón y cerdos. No se observa ninguna reactividad cruzada en vaca, perro, caballo, y rata.

Patrón de tinción: Citoplasmático y/o membrana.

Concentración stock: 500 µg/ml.

Dilución usada: 1/200.

**COX-2** (*Mouse Anti-Human COX-2 (Cyclooxygenase-2)*). BD Biosciences.

Clona: 33.

Isotipo: *Mouse IgG1*, kappa.

Especificidad: El clon 33 es específico para el péptido utilizado para inmunización. En experimentos de transferencia *Western-Blotting* e inmunoprecipitación, se demostró que el 33 identifica la COX-2 humana inducible utilizando IL-1 $\alpha$  o células endoteliales de la vena umbilical PMA (HUVEC). El bloqueo peptídico del anticuerpo con el inmunógeno de la COX-2 eliminó toda la reactividad.

Patrón de tinción: Citoplasmático.

Concentración stock: 250 µg/ml.

Dilución usada: 1/50.

**IGF-1R** (*Mouse Anti-Human IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor) Monoclonal Antibody*). Biosource International. Invitrogen Immunodetection.

Clona: 24-31.

Isotipo: *Mouse IgG1*.

Especificidad: Este anticuerpo monoclonal reconoce una proteína de 125 kDa, identificada como la subunidad  $\alpha$  del receptor de la isoforma 1 del factor de crecimiento parecido a Insulina. El epítipo reconocido por este anticuerpo se localiza entre los residuos aminoacídicos 283-440 (exón 4-6). Este anticuerpo no demuestra ninguna reactividad cruzada con el receptor de la insulina. Este anticuerpo es específico para IGF-1R humana.

Patrón de tinción: Membrana y/o citoplasma.

Concentración stock: 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Dilución usada: 1/25.

**p73** (*p73 Monoclonal Antibody*). Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection.

Clona: p73-9F7

Isotipo: *Mouse IgG1*.

Especificidad: Este anticuerpo es específico de la región alfa de la proteína p73 humana.

No reacciona con p73 de roedores.

Patrón de tinción: Nuclear.

Concentración stock: 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Dilución usada: 1/250.

**MLH-1** (*Mouse anti-MLH-1*). Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection.

Clona: 14

Isotipo: *Mouse IgG1*, kappa.

Especificidad: Este anticuerpo reacciona con la proteína MLH-1 humana (~87 kDa), no ha mostrado reactividad cruzada con ratón.

Patrón de tinción: Nuclear.

Concentración stock: 500 µg/ml.

Dilución usada: 1/50.

**MSH-2** (*Mouse anti-MSH-2*). Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection.

Clona: FE11

Isotipo: *Mouse IgG1*, kappa.

Especificidad: Este anticuerpo reacciona con la proteína MSH-2 humana (~100 kDa). El epítipo que reconoce está localizado en el extremo carboxi-terminal de MSH-2.

Patrón de tinción: Nuclear.

Concentración stock: 500 µg/ml.

Dilución usada: 1/50.

**Ki-67** (*Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen*). Dako Diagnósticos, S.A.

Clona: MIB-1.

Isotipo: *Mouse IgG1*, kappa.

Especificidad: Este anticuerpo reconoce la proteína nuclear Ki-67, característica en el proceso de las fases activas del ciclo celular, estando ausente en las células en reposo.

Muestra reacción cruzada con proteína equivalente a la Ki-67 en diversos mamíferos.

Patrón de tinción: Nuclear.

Concentración stock: 200 µg/ml.

Dilución usada: 1/100.

**Tabla 3.13.1.- Anticuerpos primarios utilizados**

Antígeno	Origen/Tipo	Dilución	Compañía	Referencia
VEGF	Mouse/IgG2b	1:200	BD Biosciences	555036
COX-2	Mouse/IgG1	1:50	BD Biosciences	610204
IGF-1R	Mouse/IgG1	1:25	Invitrogen Immunodetection	AHR0321
p73	Mouse/IgG1	1:250	Invitrogen Immunodetection	32-4200
MLH-1	Mouse/IgG1	1:50	Invitrogen Immunodetection	33-7800
MSH-2	Mouse/IgG1	1:50	Invitrogen Immunodetection	33-7900
Ki-67	Mouse/IgG1	1:100	Dako Diagnósticos	GA626

### 3.13.2.- Sistema de revelado

#### **Dako EnVision+ System** (Dako Diagnósticos, S.A.)

El sistema DakoCytomation EnVision+ System, HRP es una técnica de tinción IHQ que se realiza en dos pasos. El sistema se basa en un polímero marcado de HRP que está conjugado con anticuerpos secundarios. El polímero marcado no contiene avidina ni biotina. Por ello, la tinción no específica que resulta de la actividad endógena avidina-biotina en hígado, riñón, tejido linfático y en cortes realizadas con criostato puede eliminarse o reducirse significativamente.

Este sistema es un método extremadamente sensible y, por ello, las diluciones óptimas de anticuerpo primario son hasta veinte veces superiores comparadas con aquellas que se utilizan en las técnicas PAP más tradicionales y varias veces más altas que las de métodos tradicionales ABC o LSAB. Este protocolo ofrece un sistema de generación de señal potenciada para la detección de antígeno presente a baja concentración, para un aumento de la intensidad de tinción aumentada en compensación por el bajo título del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios de ratón reaccionan bien con el polímero marcado. La interpretación clínica de toda tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la presentación clínica, la morfología y de otros criterios histopatológicos.

### 3.13.3.- Otros

#### **Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (x 10)** (Dako Diagnósticos, S.A.)

Tampón Tris/EDTA, pH 9. Cada frasco contiene 500 ml de reactivo, concentrado x 10.

Es un reactivo diseñado especialmente para obtener un rendimiento óptimo al utilizarlo para la recuperación de epítipo inducida por calor en secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol antes de su tinción manual o de su tinción en los DakoCytomation Autostainer Instruments. Además, *DakoCytomation Target Retrieval Solution*, pH 9, es adecuado como solución de recuperación de epítipo antes de la tinción de frotis de células y muestras citocentrifugadas. La solución de trabajo se prepara diluyendo el concentrado a 1:10 en agua destilada o desionizada.

#### **Dako Target Retrieval Solution, pH 6 (x 10)** (Dako Diagnósticos, S.A.)

Tampón Citrato, pH 6. Cada frasco contiene 500 ml de reagente, concentrado x 10.

Reactivo diseñado para uso en inmunohistoquímica, utilizado para la recuperación de epítipo inducida por calor en secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol. La solución de trabajo se prepara diluyendo el concentrado a 1:10 en agua destilada o desionizada.

#### **Dako Phosphate buffer saline, pH 7 (PBS)** (Dako Diagnósticos, S.A.)

Se utiliza para preparar soluciones salinas tamponadas, que son necesarias en muchos procesos inmunohistoquímicos, de citometría de flujo y de hibridación *in situ*.

Contenido: fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico y cloruro sódico. Dando una solución resultante de 1L, fosfato sódico 0,02 mol/l, NaCl 0,15 mol/l, pH 7.

**Albumin from porcine serum** (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

La albúmina es una proteína utilizada en aplicaciones de biología molecular, como agente bloqueante en soluciones de hibridación y como agente de estabilización en soluciones peptídicas.

Se prepara en solución junto con PBS y Tween 20, y es usado como agente de bloqueo de uniones inespecíficas.

**Dako Hematoxylin** (Dako Diagnósticos, S.A.)

Solución acuosa de hematoxilina, en frasco de 1000 ml.

*Dako Hematoxylin* está diseñado para la tinción primaria de núcleos (azul) en cortes de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina, cortes congelados y preparaciones de células.

La hematoxilina se extrae del duramen del campeche, *Haemotoxylon campechianum*, el producto de oxidación, la hemateína, que por ser catiónica o básica, tiñe el núcleo celular de color azul/negro.

**Dako Eosin** (Dako Diagnósticos, S.A.)

Solución acuosa de eosina, en frasco de 1000 ml.

*Dako Eosin* está diseñada para la tinción primaria del citoplasma (rojo) en cortes de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina, cortes congelados y preparaciones de células.

La eosina es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva. Por ello colorea componentes y orgánulos citoplasmáticos.

**Dako Mounting Medium** (Dako Diagnósticos, S.A.)

*Dako Mounting Medium* se ha diseñado para el montaje permanente de cortes de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina, cortes congelados y preparaciones de células adheridos a portaobjetos de vidrio. Es un medio de montaje de baja viscosidad y secado rápido.

Se trata de un medio de montaje permanente y es compatible con los agentes de aclarado de xileno (aromáticos) y sin xileno (alifáticos).

**Tween 20** (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

Agente tensoactivo aniónico (polisorbato 20) usado como detergente y emulsionante y como agente bloqueante de membranas en inmunoensayos.

**Tritón X-100** (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

Agente tensoactivo aniónico (Octifenol polimerizado), usado como elemento emulsionante y en preparaciones para lisis celulares.

**Sodium Azide** (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

Acida sódica. Conservante utilizado en reactivos de laboratorio.

**Hydrogen peroxide solution** (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

Solución de peróxido de hidrógeno al 30% V/V.

Utilizado en la saturación de la peroxidasa endógena del tejido, actuando por exceso de sustrato.





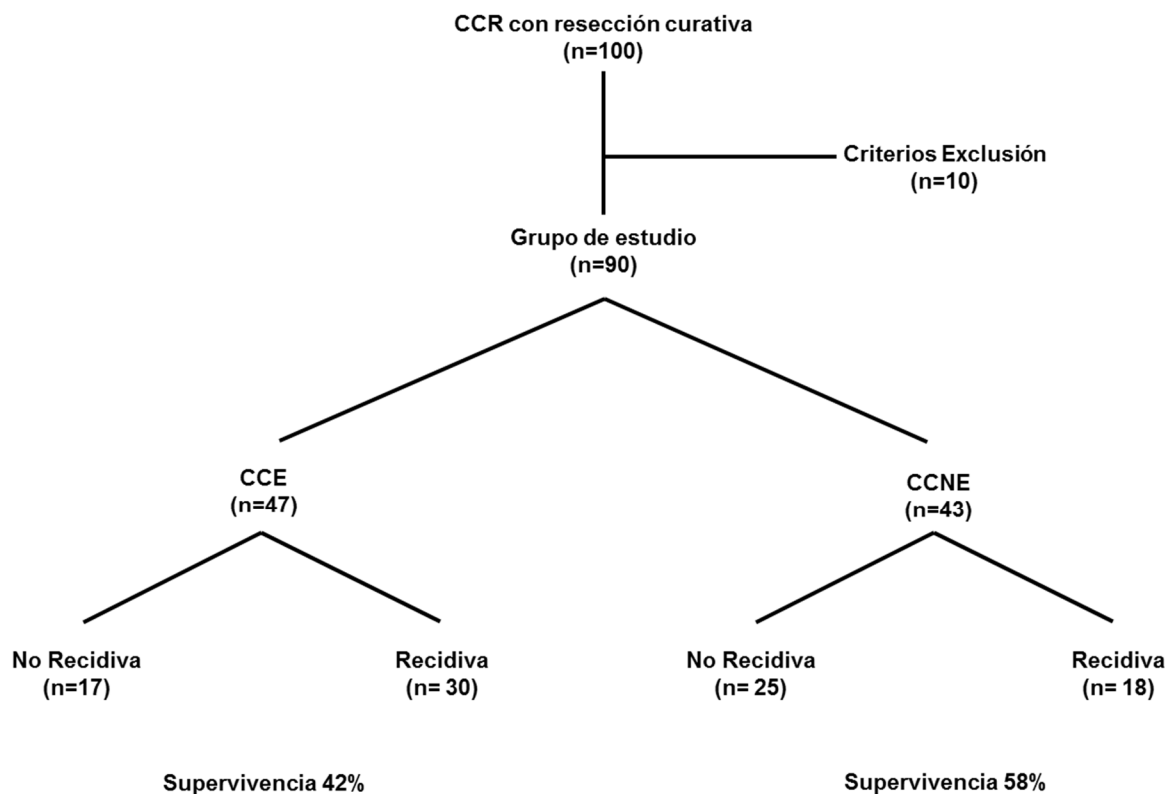
## **IV.- RESULTADOS**



#### 4.1.- DATOS DE LA MUESTRA, CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y DEL TUMOR

Se seleccionaron aleatoriamente cien pacientes intervenidos de cáncer colorrectal en la Unidad de Cirugía de Urgencias de los HHUU Virgen del Rocío, con un periodo de seguimiento de cinco años. Diez de estos pacientes quedaron excluidos del estudio por presentar neoplasias sincrónicas, por complicaciones peri-quirúrgicas, por no presentar pieza operatoria en el servicio de anatomía patológica, o por continuar el tratamiento de la patología en otro centro hospitalario (Figura 4.1).

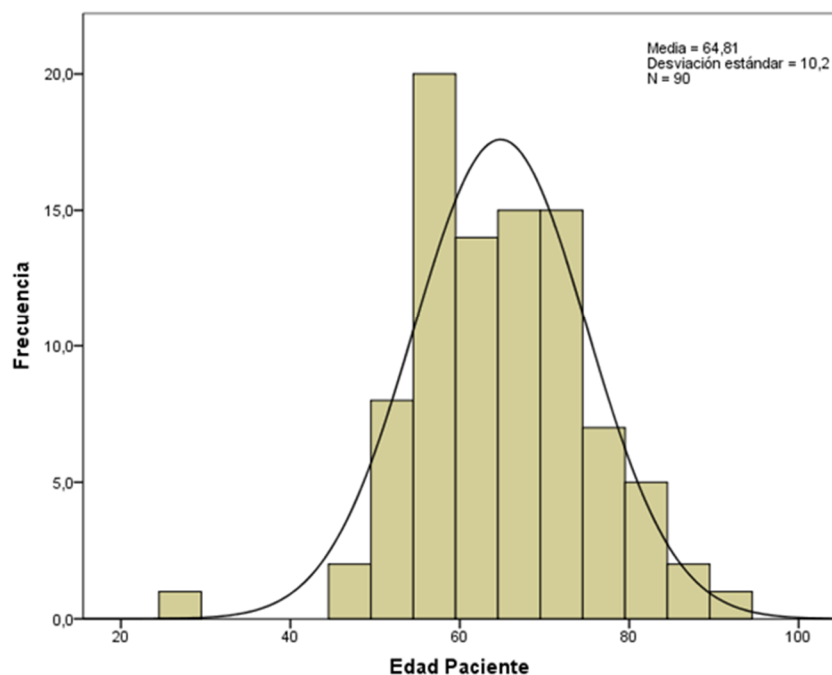
Figura 4.1.- Diagrama de flujo del grupo de estudio



#### 4.1.1.- Características demográficas

La edad de los pacientes varió entre los 27 y los 91 años, con una edad media en el momento del diagnóstico de la neoplasia de  $64,8 \pm 10,2$  años. La edad siguió el modelo normal de campana de *Gauss* ( $p=0,200$ , test de Kolmogorov-Smirnov) (Figura 4.1.1). Hubo una distribución homogénea de individuos ( $n=45$ ) respecto a los grupos generados a los dos lados de la media.

**Figura 4.1.1.- Distribución edad de los pacientes**



Consideramos el paciente de 27 años como un valor atípico, *outlier*, respecto a la variable edad, lo que nos ajustó la distribución en el test de normalidad utilizado ( $p=0,178$ ).

La relación de pacientes en función del sexo se acercó a la paridad (Sex ratio 109), el 52,2% de la muestra eran hombres ( $n=47$ ) y el 47,8% mujeres ( $n=43$ ).

#### 4.1.2.- Características clínicas

Los síntomas que presentaron los individuos como motivo de consulta, excluyendo la obstrucción, se dividieron en presencia de dolor y distensión abdominal 59% ( $n=53$ ), melenas 9% ( $n=8$ ) y rectorragias 39% ( $n=35$ ). Algunos pacientes presentaron

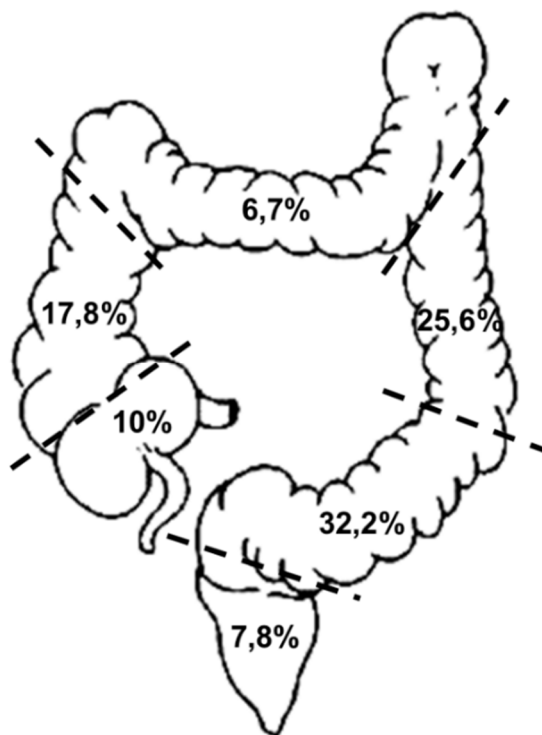
sintomatología múltiple, donde el dolor abdominal se asoció a las rectorragias (24,5%) y a las melenas (6%).

Al mismo tiempo, pudo observarse la aparición de otros síntomas generales como la pérdida de peso involuntaria, tenesmo, cambios en el hábito deposicional y debilidad o fatiga, estos preponderaron en la casuística, aunque no fueron la razón preferente de la llegada al centro hospitalario.

Los niveles de antígeno carcinoembrionario preoperatorio sólo se reflejaron, en el historial clínico correspondiente, en 24 individuos. Posiblemente debido a la naturaleza del estudio, el número de datos recogidos fue tan bajo. El valor medio de CEA preoperatorio fue de  $65,2 \pm 228,3 \mu\text{g/l}$ , con unos valores que oscilaron entre 1 y 1124  $\mu\text{g/l}$ . Catorce de los veinticuatro pacientes presentaron valores anormales del marcador ( $\geq 5 \mu\text{g/l}$ ).

La localización de la neoplasia primaria se distribuyó en Ciego (n=9, 10%), Colon ascendente (n=16, 17,8%), Colon transverso (n=6, 6,7%), Colon descendente (n=23, 25,6%), Sigma (n=29, 32,2%) y Recto (n=7, 7,8%) (Figura 4.1.2).

**Figura 4.1.2.- Localización neoplasia primaria**



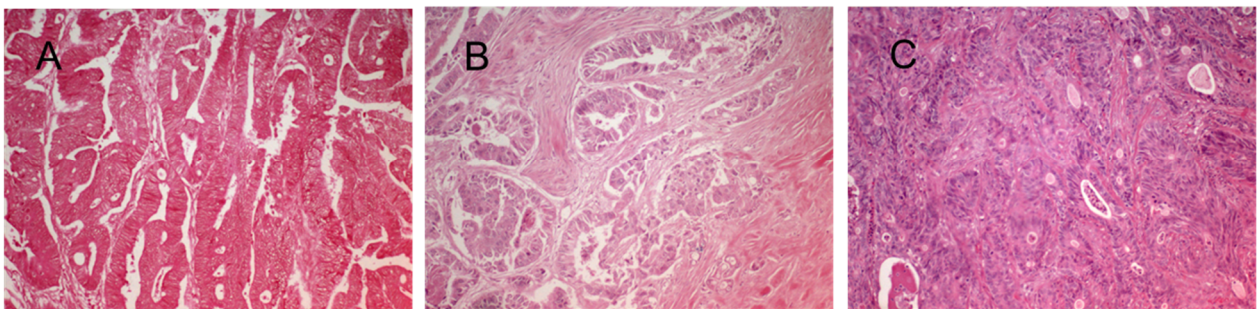
Para este estudio empleamos la clasificación del estadio clínico basándonos en el sistema tumor-linfonodo-metástasis (UICC y AJCC). El acto quirúrgico, el informe del patólogo, así como pruebas de imagen (RMN, TAC, PET y ECO) anteriores y posteriores a la intervención, sirvieron para estadificar la neoplasia. En el momento del debut de la enfermedad, el estadio TNM de los individuos fue de: Estadio I (n=10, 11,1%); Estadio II (n=40, 44,4%); Estadio III (n=29, 32,2%) y Estadio IV (n=11, 12,2%). En aquellos pacientes que presentaron extensión diseminada al diagnóstico, la localización de la metástasis se distribuyó en hígado, pulmón, zona peritoneal, ósea y cerebral, siendo el hígado el lugar más frecuente para su localización (54%).

#### **4.1.3.- Características histopatológicas del tumor**

Acto seguido de estudiar el informe de anatomía patológica, utilizando los datos obtenidos del estudio macro y microscópico de la pieza, se valoró las características histopatológicas del tumor. Respecto al tamaño de la neoplasia, ésta osciló entre un mínimo de 1,5 cm y un máximo de 8,5 cm, con un tamaño medio tumoral de  $4,9 \pm 1,8$  cm. El 47% de los casos presentaron un tamaño de la lesión igual o superior a los 5 cm. El tipo histológico de los tumores seleccionados fue adenocarcinomas en todos los casos, no se observó tumores colorrectales del tipo mucinoso o de células en anillo de sello.

El grado de diferenciación histológico se evaluó mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina en las muestras procedentes del tumor primario (Figura 4.1.3).

**Figura 4.1.3.- Grado de diferenciación histológico en cáncer colorrectal**



A. Bien diferenciado. B. Moderadamente diferenciado. C. Pobrementemente diferenciado

Fue dividido en grado I o bien diferenciado (n=40, 44,4%), grado II o moderadamente diferenciado (n=32, 35,6%) y grado III o pobremente diferenciado (n=18, 20%). Posteriormente se agruparon en diferenciados (n=72, 80%) o indiferenciados (n=18, 20%).

El 48% de los tumores presentaron un signo evidente de presencia de infiltrado linfocitario, con abundante celularidad inflamatoria, afectando al componente glandular y/o estroma. La manifestación de linfocitos y macrófagos fue más definida en el frente de infiltración del tumor a capas más profundas.

#### **4.1.4.- Seguimiento oncológico**

Tras la resección de la neoplasia primaria, los pacientes fueron sometidos a un seguimiento quirúrgico y oncológico.

Una de las herramientas no invasivas, utilizadas para la valoración de la evolución de la enfermedad fue la determinación plasmática del marcador tumoral antígeno carcinoembrionario. Los niveles de CEA postoperatorios registrados en nuestros pacientes, oscilaron entre 0,7 y 1361 µg/l, con un nivel medio de  $57,4 \pm 203,7$ . El 46% de los individuos de la muestra, presentó un nivel anormal  $\geq 5$  µg/l de antígeno carcinoembrionario. Cuarenta y ocho pacientes (53,3%) presentaron recurrencia en la enfermedad en el seguimiento, dieciocho individuos (20%) fue de manera local, y treinta (33,3%) por presencia de metástasis a distancia. El lugar más común de las metástasis fue el hígado (40%), seguido del pulmón (20%), zona peritoneal y retroperitoneal (15%) y otros lugares menos comunes (cerebro, hueso, etc.) (25%). El tiempo medio de aparición de recidiva en los pacientes de la muestra fue de 37,2 meses (intervalo de confianza del 95%; 32,5-41,8 meses).

El periodo medio de seguimiento de los pacientes fue de  $41,38 \pm 19,9$  meses (0-60 meses). Con una tasa de supervivencia observada del 50% a los 5 años. En la tabla 4.1.1 se representa la tasa de supervivencia en función del estadio clínico de los pacientes en el momento de diagnóstico.

**Tabla 4.1.4.- Supervivencia de los pacientes y estadio clínico**

Estadio clínico	Supervivencia a los 5 años	Valor p
Estadio I	80%	
Estadio II	65%	
Estadio III	44,80%	
Estadio IV	18,20%	0,033 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

## 4.2.- ESTENOSIS

Se clasificaron como cáncer colorrectal estenosante (CCE) aquellos en los que se recogieron datos clínicos de oclusión o suboclusión intestinal y/o aquellos que el informe de anatomía patológica definió como estenosantes (n=47, 52,2%). El resto de los tumores fueron clasificados como cáncer colorrectal no estenosante (CCNE) (n=43, 47,8%).

### 4.2.1.- Estenosis y variables clínico-patológicas

En la tabla 4.2.1 se muestra la asociación entre la presencia de estenosis y las variables clínico-patológicas.

El debut de la neoplasia como obstrucción intestinal se correlacionó estadísticamente con la edad del paciente ( $p=0,037$ ), aquellos pacientes con más de 65 años fueron más proclives a padecerla ( $p=0,045$ ). No hubo asociación estadística entre la presencia de CCE y el sexo de los individuos ( $p=0,539$ ).

La estenosis se presentó preferentemente como cuadro clínico de dolor abdominal (40%) ( $p<0,001$ ), la presencia de rectorragias en los pacientes con oclusión, fue un síntoma poco frecuente (n=8) ( $p<0,001$ ).

El 42,2% de las neoplasias localizadas a partir del ángulo esplénico debutaron como estenosis ( $p<0,001$ ).



Del mismo modo, el tamaño del tumor se vinculó con la estenosis ( $p<0,001$ ), los pacientes con neoplasia obstructiva, presentaron un diámetro de la neoplasia superior a aquellos con CCNE.

Aunque el nivel medio de CEA preoperatorio fue mayor en el grupo de individuos con CCE, la obstrucción intestinal no se relacionó con valores de CEA anormales ( $\geq 5 \mu\text{g/l}$ ), presentando estos valores el 25% de los individuos ( $p=0,729$ ). En cambio, cuando se hizo el seguimiento de los pacientes, el antígeno carcinoembrionario presentó una distribución distinta, la mayoría de los individuos con CCE presentaron niveles circulantes superiores a  $5 \mu\text{g/l}$  ( $p<0,001$ ).

No se asoció la presencia de estenosis con el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,833$ ), ni con el grado de infiltración inflamatorio ( $p=0,300$ ). La obstrucción intestinal concordó con un estadio más avanzado de la enfermedad (Estadio TNM 3-4) ( $p=0,009$ ), invadiendo la serosa el 51,1% de los tumores que debutaron como estenosis intestinal ( $p=0,002$ ). El 38,9% de los pacientes con CCNE no presentaron invasión de nodos linfáticos ( $p=0,001$ ).

**Tabla 4.2.1.- Estenosis y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Estenosis		Valor p
		CCNE	CCE	
Casos	90	43	47	
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		21	26	
Mujer		22	21	0,539 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	62,5 ± 7,5 (47-81)	66,9 ± 11,8 (27-91)	0,037 <sup>b</sup>
< 65	45	26	19	
≥ 65	45	17	28	0,045 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,02 ± 1,4 (1,5-8)	5,7 ± 1,7 (2-8,5)	<0,001 <sup>c</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	18	38	
Der. Áng. Esplénico	34	25	9	<0,001 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	9	9	
Diferenciado	72	34	38	0,833 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	23	20	
Ausencia	47	20	27	0,300 <sup>a</sup>
Dolor Abdominal				
No	37	26	11	
Si	53	17	36	<0,001 <sup>a</sup>
Rectorragias				
No	55	16	39	
Si	35	27	8	<0,001 <sup>a</sup>
Melenas				
No	82	39	43	
Si	8	4	4	0,895 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	10	1	
Si	79	33	46	0,002 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	35	22	
Si	33	8	25	0,001 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	30	20	
III-IV	40	13	27	0,009 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)		21,7 ± 43,3 (1,9-150)	102,12 ± 308 (1-1124)	0,82 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	5	5	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	8	6	0,729 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	43,7 ± 180 (0,7-1124)	69,9 ± 224,1 (0,7-1362)	<0,001 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l		33	16	
Anormales ≥ 5 µg/l		10	31	<0,001 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>; b t-Student; c U de Mann-Whitney

#### 4.2.2.- Estenosis y aparición de recidiva

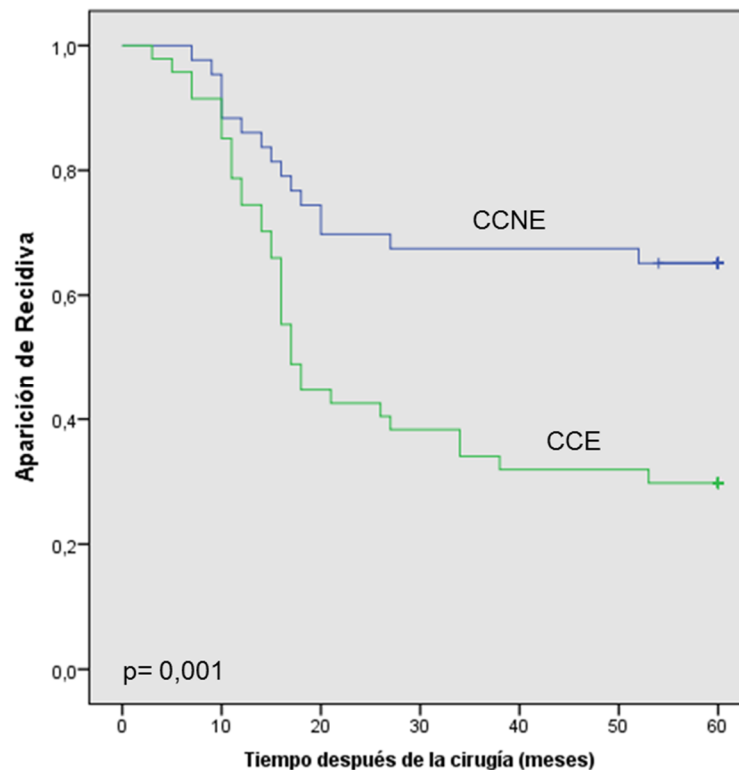
Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la aparición de recidiva local y/o a distancia y las relacionamos con la obstrucción como debut de la enfermedad.

Las curvas de recurrencia respecto a la estenosis se muestran en la Figura 4.2.2.

El tiempo medio de aparición de recidiva para individuos sin obstrucción fue de 45 meses (Intervalo de Confianza 95%, 38,7-51,4 meses). Para los individuos con obstrucción el tiempo medio fue de 29,9 meses (Intervalo de Confianza 95%, 23,8-36 meses).

Encontramos una correlación significativa entre los individuos con neoplasia obstructiva y la recurrencia ( $p=0,001$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

**Figura 4.2.2.- Estenosis y recidiva**



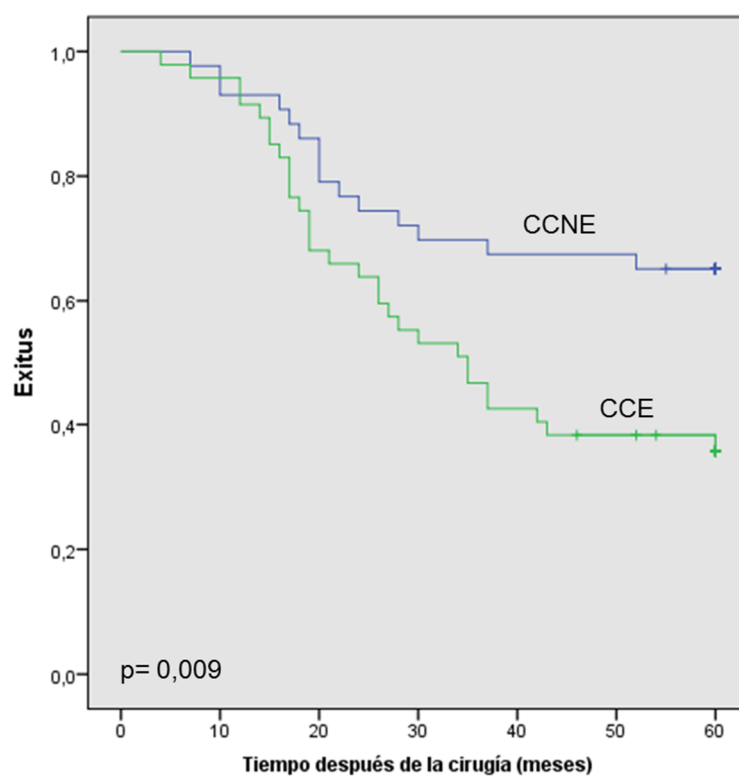
#### 4.2.3.- Estenosis y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la estenosis se muestran en la Figura 4.2.3.

La presencia de obstrucción en el debut de la neoplasia fue un importante factor pronóstico respecto a la supervivencia ( $p=0,009$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

El tiempo medio de supervivencia en individuos con CCNE fue de 46,8 meses (Intervalo de Confianza 95%, 41-52,5 meses). Para los individuos con CCE el tiempo medio de supervivencia fue de 37,1 meses (Intervalo de Confianza 95%, 31,4-42,9 meses).

**Figura 4.2.3.- Estenosis y supervivencia**



#### 4.3.- MSI (MLH-1 y MSH-2)

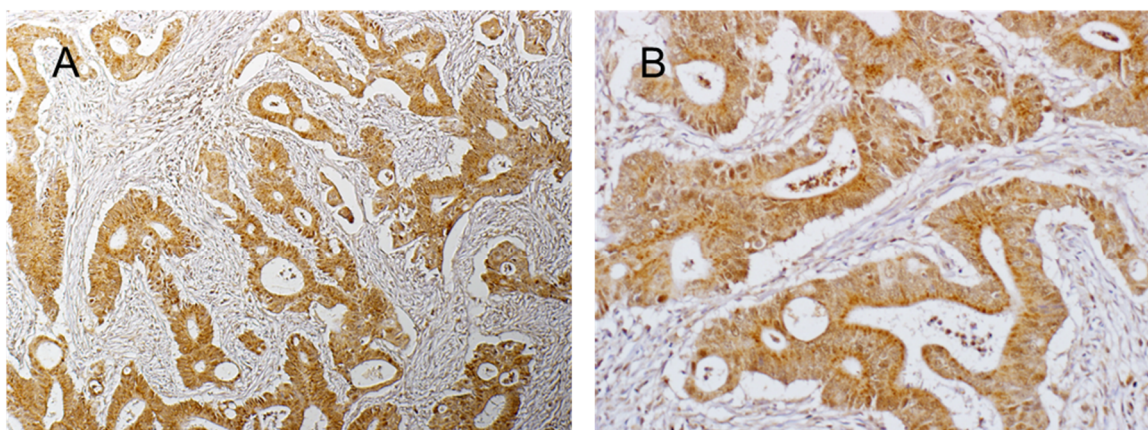
Se consideró inactivación de MLH1 y/o de MSH2 (hMLH-1, hMSH-2), cuando existió una ausencia total de tinción nuclear en las células tumorales, pero ésta estuvo presente en las células normales del epitelio. La tinción positiva nuclear del epitelio no tumoral adyacente, de células estromales o de linfocitos sirvió como control interno positivo de la técnica.

Tras evaluar los patrones de tinción de las proteínas MMR en células tumorales, observamos una marcada expresión de MLH-1 y MSH-2, en el epitelio colónico (Figuras 4.3.1 y 4.3.2). La mayoría de los focos tumorales presentaban una clara manifestación positiva para ambas proteínas.

Concluimos que el estudio de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) por inmunohistoquímica resultó negativo para todos los casos.

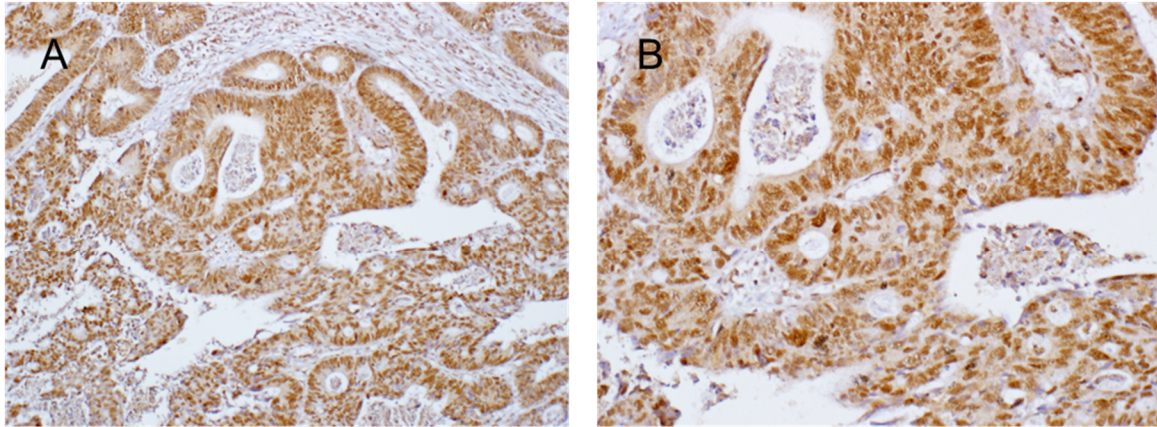
No fue necesario el análisis estadístico de la relación entre la expresión de estas proteínas y las variables clínico-patológicas estudiadas, así como los estudios de recidiva y supervivencia asociados.

**Figura 4.3.1.- Expresión de MLH-1 en células epiteliales tumorales**



A. Expresión positiva de MLH-1 en neoplasia de colon (x100). B. Expresión positiva de MLH-1 en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

**Figura 4.3.2.- Expresión de MSH-2 en células epiteliales tumorales**



A. Expresión positiva de MSH-2 en neoplasia de colon (x100). B. Expresión positiva de MSH-2 en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorehídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.



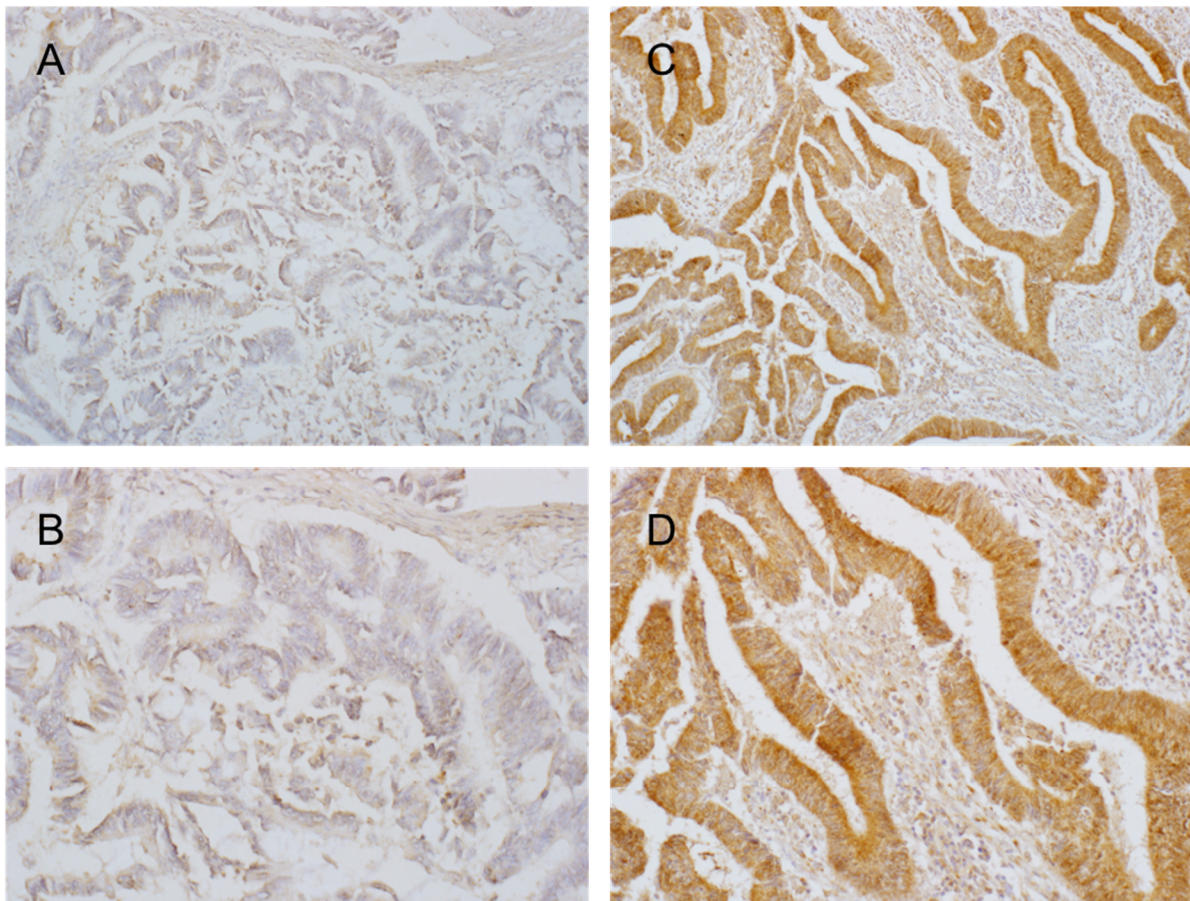
#### 4.4.- VEGF

##### 4.4.1.- Expresión de VEGF

Tras analizar las muestras al microscopio, encontramos inmunorreactividad positiva de VEGF en el citoplasma de las células epiteliales tumorales, del mismo modo, se pudo observar en células epiteliales normales y del estroma. Como dato significativo se advirtió la expresión de VEGF en el endotelio vascular.

Tras la evaluación *de visu*, el porcentaje de positividad de expresión de VEGF(+), en nuestras muestras, fue del 34,4% (n=31), mientras que el resto, 65,6% (n=59) se consideró VEGF(-).

**Figura 4.4.1.1.- Expresión de VEGF en células epiteliales tumorales**



A. Expresión negativa de VEGF en neoplasia de colon (x100). B. Expresión negativa de VEGF en neoplasia de colon (x200). C. Expresión positiva de VEGF en neoplasia de colon (x100). D. Expresión positiva de VEGF en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

En el análisis de imagen, la media de intensidad fue de  $41,97 \pm 31,7$ , con unos valores comprendidos entre 11,75 y 99,5. Las muestras VEGF(+), presentaron una media de expresión  $85 \pm 6,7$ , mientras que las VEGF(-) presentaron una intensidad media de  $19,35 \pm 3$ .

Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación, no se encontraron valores discordantes entre ambos métodos, obteniendo un valor de correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.4.1.2).

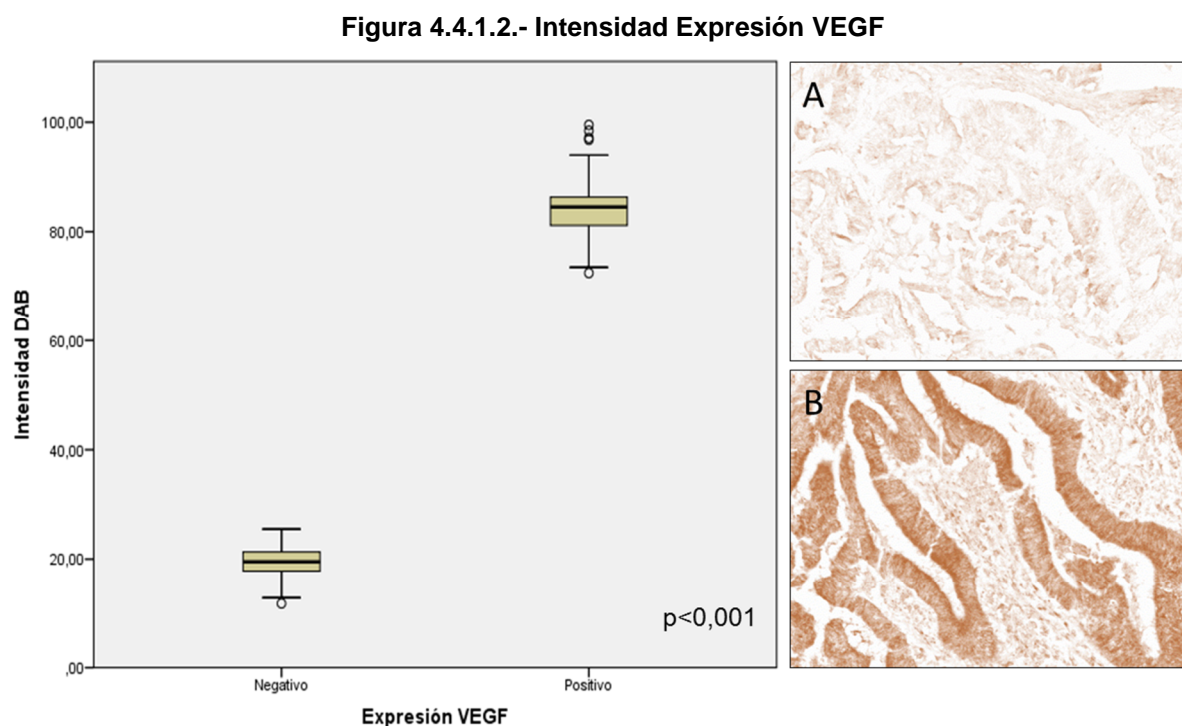


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión negativa de VEGF en neoplasia de colon. B. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión positiva de VEGF en neoplasia de colon.



#### 4.4.2.- Correlación de la expresión de VEGF y los parámetros clínico-patológicos

En la Tabla 4.4.2 se muestra la asociación entre la expresión de VEGF y los parámetros clínico-patológicos.

La expresión de VEGF no se relacionó con la edad ni el sexo de la cohorte. Se encontró correlación estadísticamente significativa con el tamaño tumoral ( $p=0,025$ ), presumiendo un diámetro de neoplasia primaria mayor, en aquellos tumores con expresión positiva de VEGF, con un tamaño medio de  $5,5 \pm 1,7$  cm.

Asimismo observamos una tendencia asociativa entre la expresión de VEGF y el debut de la neoplasia como obstrucción intestinal, con una significancia de  $p=0,01$ . Aquellos individuos cuyos niveles de VEGF fueron más bajos, tuvieron una probabilidad menor de presentar obstrucción asociada al cáncer colorrectal. No se encontraron diferencias relativas a la expresión de VEGF y la localización anatómica de la neoplasia.

Parece ser, que la mayor expresión de VEGF no está vinculado con el grado de diferenciación histológico, no existiendo diferencias entre ambos grupos. Tampoco hubo disparidades respecto a la presencia de infiltrado linfocitario ( $p=0,421$ ).

Las neoplasias con mayor manifestación de VEGF, presentaron un mayor grado de penetración en la pared intestinal superior ( $p=0,01$ ), invadiendo la capa serosa en la mayoría de los casos. Asimismo se asoció al compromiso ganglionar ( $p<0,001$ ), aquellos tumores con menor expresión de VEGF presentaron una probabilidad menor de invasión en ganglios linfáticos. Por tanto, la expresión elevada de VEGF en el tumor coligó con un estadio TNM avanzado (III-IV) ( $p<0,001$ ).

Cuando enfrentamos los valores del antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorio, con la expresión de VEGF, no apareció diferencia significativa alguna, por lo que consideramos no están asociados. Por el contrario, los valores de CEA durante el seguimiento del paciente, fueron más elevados entre los afectados con una sobreexpresión de VEGF ( $p=0,013$ ), aunque no llegó a haber diferencias entre los grupos dependiendo de si los valores eran superiores o no a  $5 \mu\text{g/l}$  ( $p=0,084$ ).

**Tabla 4.4.2.- VEGF y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Expresión VEGF		Valor p
		Negativo	Positivo	
Casos	90	59	31	
Intensidad Expresión	90	19,35 ± 3	85 ± 6,7	<0,001 <sup>c</sup>
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		29	18	
Mujer		30	13	0,421 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	65,05 ± 11 (27-91)	64,35 ± 8,65 (50-82)	0,76 <sup>b</sup>
< 65	45	30	15	
≥ 65	45	29	16	0,824 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,57 ± 1,7 (1,5-8,5)	5,5 ± 1,7 (3-8)	0,025 <sup>c</sup>
Estenosis				
No	43	34	9	
Si	47	25	22	0,01 <sup>a</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	34	22	
Der. Áng. Esplénico	34	25	9	0,215 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	10	8	
Diferenciado	72	49	23	0,318 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	30	13	
Ausencia	47	29	18	0,421 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	11	0	
Si	79	48	31	0,01 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	46	11	
Si	33	13	20	<0,001 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	44	6	
III-IV	40	15	25	<0,001 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)	24	33,7 ± 50 (33,7-150)	81 ± 279 (1-1124)	0,12 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	8	2	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	8	6	0,242 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	50,5 ± 140,2 (1,5-742)	61 ± 230,9 (0,7-1362)	0,013 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l		36	13	
Anormales ≥ 5 µg/l		23	18	0,084 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

b t-Student

c U de Mann-Whitney

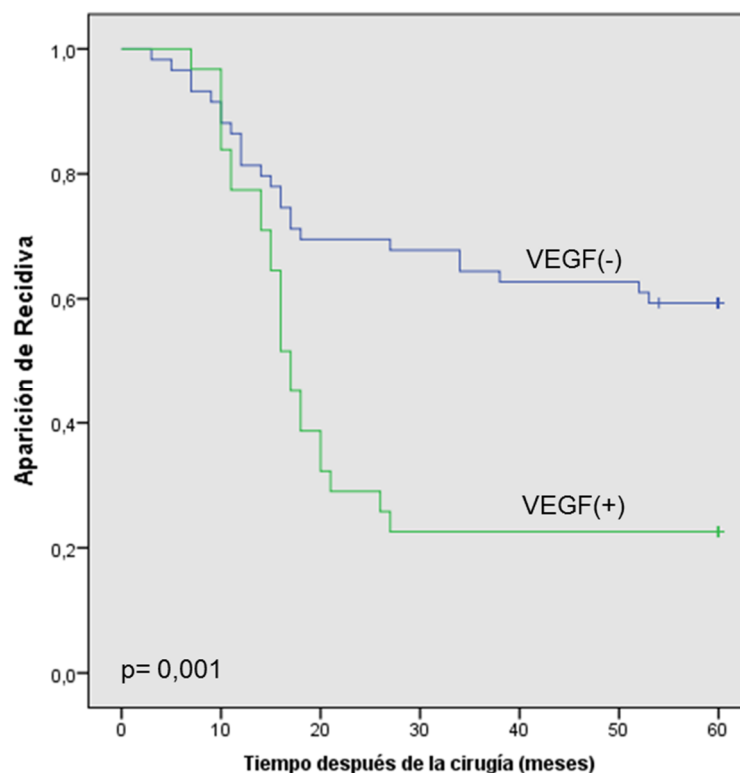
#### 4.4.3.- Correlación de la expresión de VEGF y aparición de recidiva

Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la recurrencia de la enfermedad y las relacionamos con la expresión de VEGF.

Las curvas de aparición de recidiva respecto a la expresión de VEGF se muestran en la Figura 4.4.3.

El tiempo medio de recurrencia para individuos con baja expresión de VEGF (VEGF(-)), fue de 43,2 meses (Intervalo de Confianza 95%, 37,6-49). Para los individuos con elevada expresión de VEGF (VEGF(+)), el tiempo medio correspondió a 25,7 meses (Intervalo de Confianza 95%, 19-32,4 meses). Encontramos una diferencia significativa entre la expresión de VEGF (negativo vs. positivo) en la neoplasia primaria y la recidiva en el tiempo ( $p=0,001$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

**Figura 4.4.3.- VEGF y recidiva**



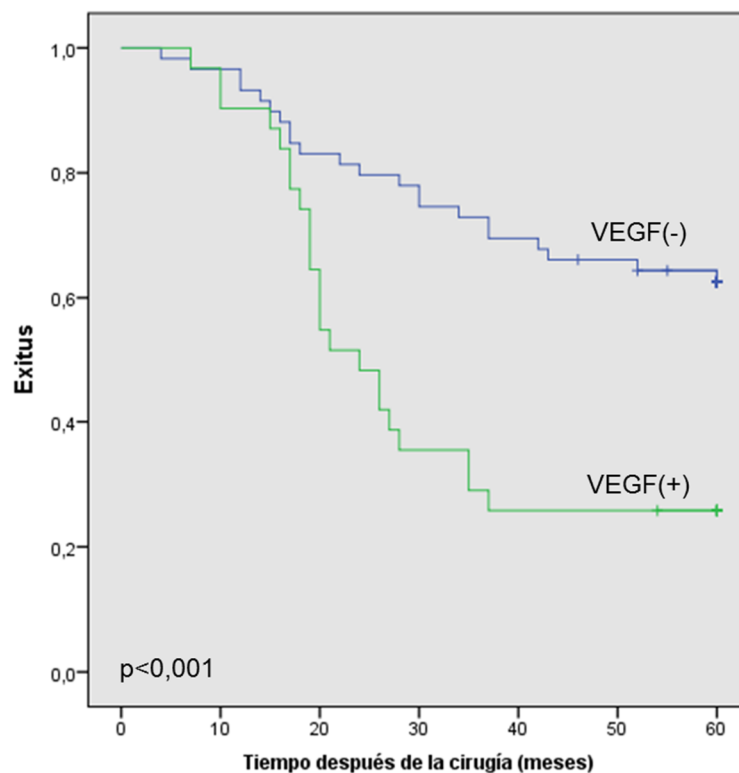
#### 4.4.4.- VEGF y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la expresión de VEGF se muestran en la Figura 4.4.4.

La expresión de VEGF en la neoplasia primaria, parece ser un importante factor pronóstico respecto a la supervivencia, con una significación estadística ( $p < 0,001$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

El tiempo medio de supervivencia en individuos con VEGF(+) fue de 31,2 meses (Intervalo de Confianza 95%, 24,7-37,6 meses). Para los individuos con VEGF(-) el tiempo medio de supervivencia fue de 47,3 meses (Intervalo de Confianza 95%, 42,4-52,2 meses).

**Figura 4.4.4.- VEGF y supervivencia**



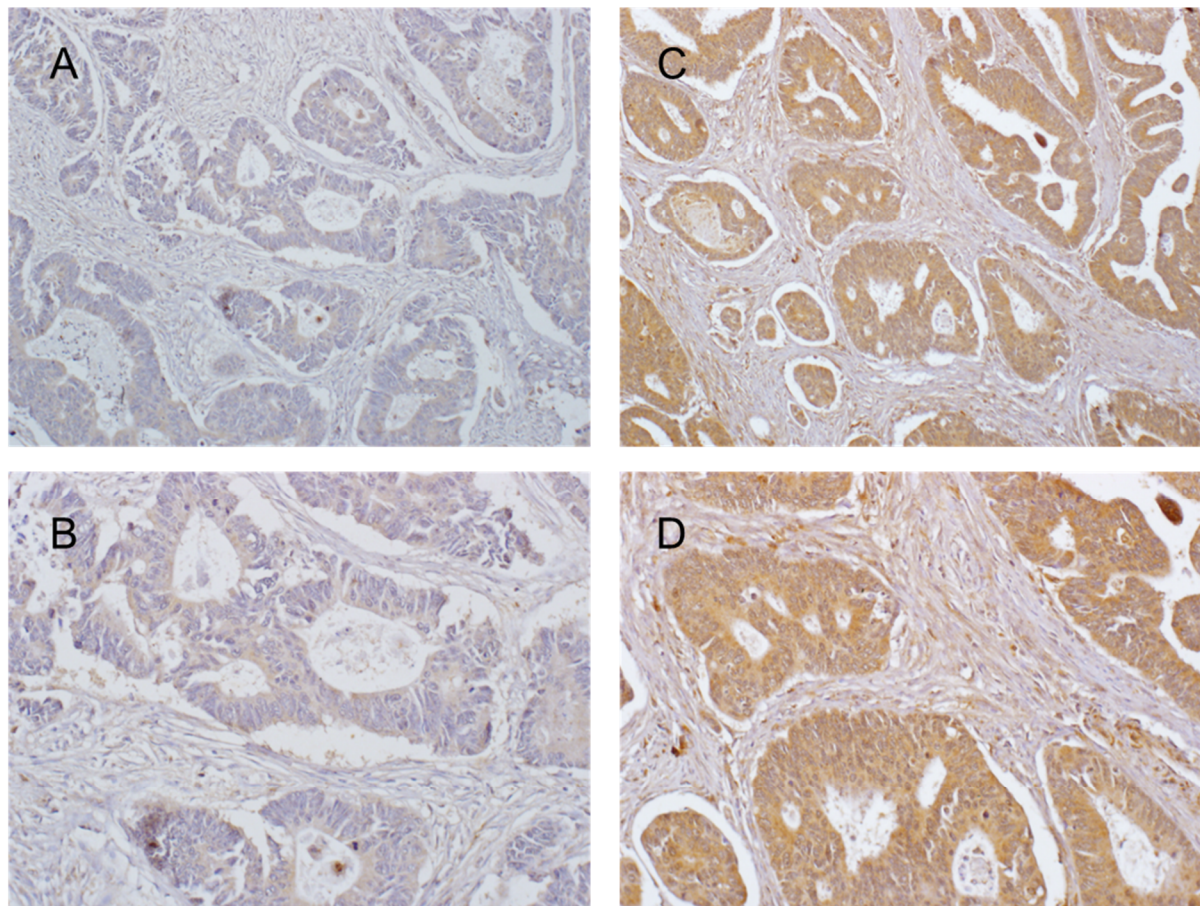
## 4.5.- COX-2

### 4.5.1.- Expresión de COX-2

Como en el caso de VEGF, encontramos inmunorreactividad de COX-2 en el citoplasma de las células epiteliales tumorales, pudiéndose observar en células epiteliales normales y del estroma. Como reseña característica, se advirtió la expresión de COX-2 en células mononucleares inflamatorias y fibroblastos.

Tras la evaluación *de visu*, el porcentaje de positividad de expresión de COX-2(+), en nuestras muestras, fue del 43,3% (n=39), mientras que el resto, 56,7% (n=51) se consideró COX-2(-).

**Figura 4.5.1.1 .- Expresión de COX-2 en células epiteliales tumorales**



A. Expresión negativa de COX-2 en neoplasia de colon (x100). B. Expresión negativa de COX-2 en neoplasia de colon (x200). C. Expresión positiva de COX-2 en neoplasia de colon (x100). D. Expresión positiva de COX-2 en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

En la evaluación de las imágenes con el software informático *ImageJ*, la media de intensidad obtenida fue de  $39,7 \pm 29$ , con unos valores comprendidos entre 11,20 y 92,5. Las muestras COX-2(+), presentaron una media de intensidad de expresión  $71,5 \pm 11,5$ , mientras que las COX-2(-) presentaron una intensidad media de  $15,4 \pm 2,2$ . Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación, no se encontraron valores discrepantes entre ambos métodos, obteniendo un valor de correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.5.1.2).

**Figura 4.5.1.2.- Intensidad Expresión COX-2**

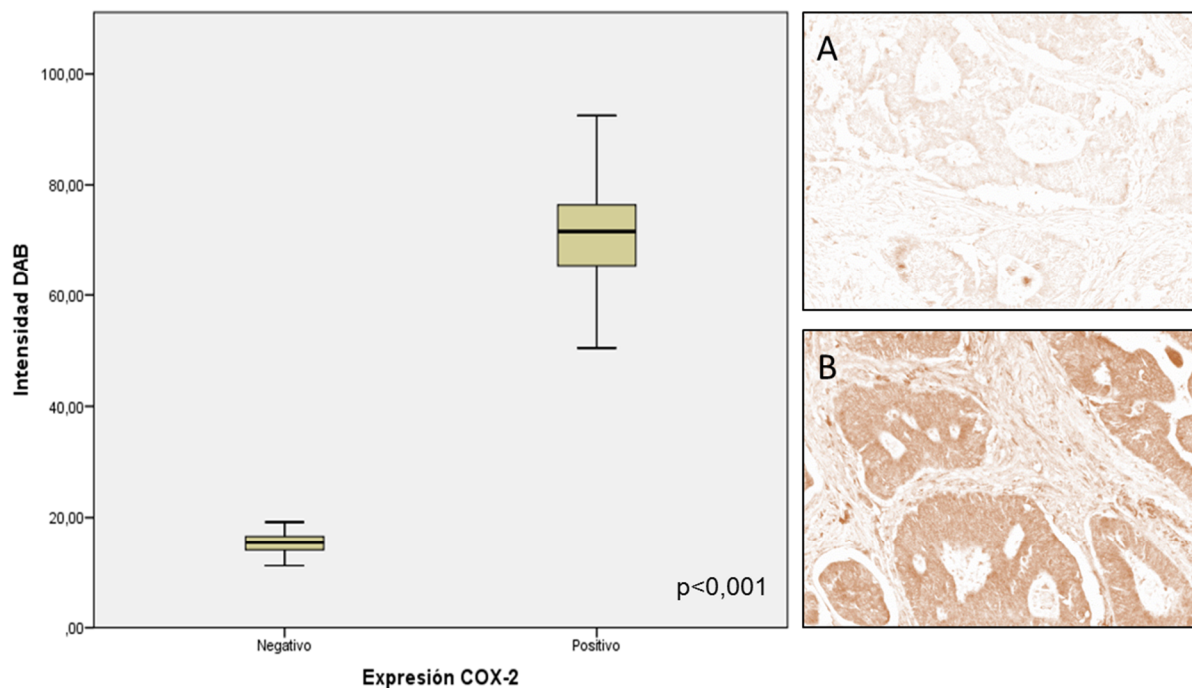


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión negativa de COX-2 en neoplasia de colon. B. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión positiva de COX-2 en neoplasia de colon.

#### 4.5.2.- Correlación de la expresión de COX-2 y los parámetros clínico-patológicos

En la Tabla 4.5.2 se muestra la asociación entre la expresión de COX-2 y los parámetros clínico-patológicos.

La inmunotinción positiva de COX-2 no guardó relación con la edad y el sexo, con una distribución homogénea entre los pacientes.

Cuando analizamos la correspondencia entre obstrucción intestinal y expresión de COX-2, encontramos un mayor número de casos que presentaron una tinción de COX-2 positiva y cuyo debut de la neoplasia, cursó con oclusión intestinal ( $p=0,01$ ). Aunque no tuvo relación con la distribución anatómica de la misma.

Asimismo los tumores con mayores niveles de COX-2, presentaron un diámetro de la neoplasia mayor, 5,4 frente a 4,5 cm ( $p=0,012$ ).

No se halló concordancia entre la expresión positiva de COX-2 y el grado de diferenciación histológico ( $p=0,089$ ), así como con el grado de infiltrado inflamatorio tumoral ( $p=0,876$ ).

Opinamos que altos niveles de COX-2 en el microambiente tumoral favorecen la infiltración de la masa a la capa serosa ( $p=0,014$ ), debiendo colaborar en la invasión de ganglios linfáticos adyacentes ( $p=0,012$ ) y por tanto beneficiando un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p=0,001$ ).

Los niveles circulantes en sangre del antígeno carcinoembrionario preoperatorio no se relacionaron con altos niveles de COX-2 en el tumor. De la misma forma que con VEGF, el nivel medio de CEA, fue mayor en los individuos con sobreexpresión de COX-2.

Cuando estudiamos el CEA correspondiente al seguimiento periódico de los pacientes, hubo valores medios mayores en el grupo de neoplasias con niveles mayores de COX-2 ( $p=0,048$ ), aunque tampoco fue un dato significativo alrededor de los 5  $\mu\text{g/l}$  ( $p=0,34$ ).

**Tabla 4.5.2.- COX-2 y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Expresión COX-2		Valor p
		Negativo	Positivo	
Casos	90	51	39	
Intensidad Expresión	90	15,4 ± 2,2	71,5 ± 11,5	<0,001 <sup>c</sup>
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		24	23	
Mujer		27	16	0,262 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	65,33 ± 10,4 (47-91)	64,13 ± 9,9 (27-82)	0,581 <sup>b</sup>
< 65	45	26	19	
≥ 65	45	25	20	0,832 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,5 ± 1,7 (1,5-8,1)	5,4 ± 1,7 (3-8,5)	0,012 <sup>c</sup>
Estenosis				
No	43	32	11	
Si	47	19	28	0,01 <sup>a</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	30	26	
Der. Áng. Esplénico	34	21	13	0,447 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	7	11	
Diferenciado	72	44	28	0,089 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	24	19	
Ausencia	47	27	20	0,876 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	10	1	
Si	79	41	38	0,014 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	38	19	
Si	33	13	20	0,012 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	36	14	
III-IV	40	15	25	0,001 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)	24	22,9 ± 45,4 (1,8-150)	95,4 ± 297 (1-1124)	0,709 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	6	4	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	8	6	0,889 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	44,5 ± 125,8 (0,7-742)	67,3 ± 247,8 (0,7-1362)	0,048 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l		30	19	
Anormales ≥ 5 µg/l		21	20	0,34 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

b t-Student

c U de Mann-Whitney



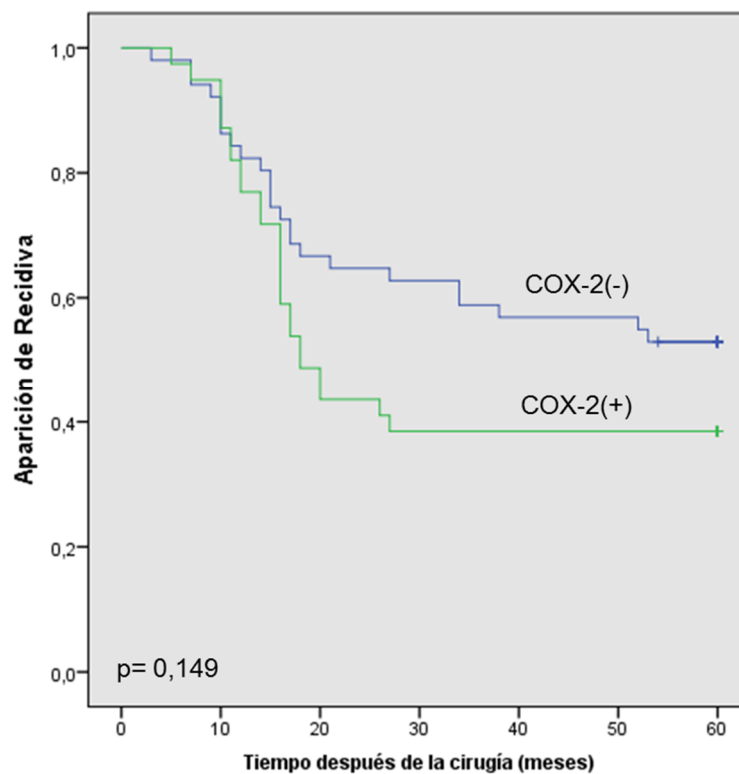
#### 4.5.3.- Correlación de la expresión de COX-2 y aparición de recidiva

Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la recurrencia de la enfermedad y las relacionamos con la expresión de COX-2.

Las curvas de aparición de recidiva respecto a la expresión de COX-2 se muestran en la Figura 4.5.3.

El tiempo medio de recurrencia para individuos con baja expresión de COX-2 (COX-2(-)), fue de 40,9 meses (Intervalo de Confianza 95%, 34,8-47). Para los individuos con elevada expresión de COX-2 (COX-2(+)), el tiempo medio correspondió a 32 meses (Intervalo de Confianza 95%, 25,3-39,3 meses). No hubo una diferencias de expresión de COX-2 entre grupos (negativo vs. positivo), para que fuera un factor predictor de la recidiva en el tiempo ( $p=0,149$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

Figura 4.5.3.- COX-2 y recidiva



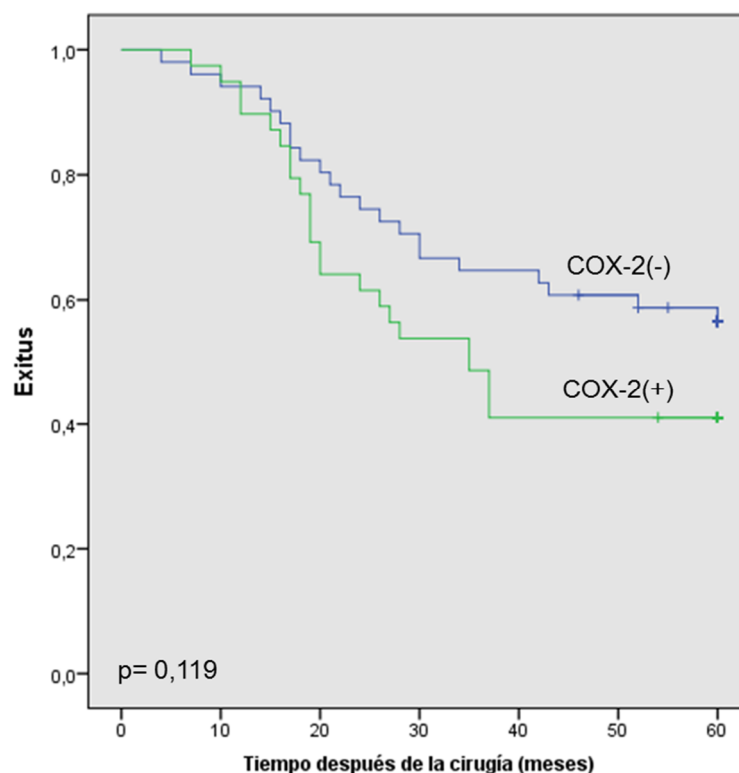
#### 4.5.4.- COX-2 y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la expresión de COX-2 se muestran en la Figura 4.5.4.

La expresión de COX-2 en la neoplasia primaria, no parece estar relacionado con la supervivencia de los pacientes, no se llegó a encontrar diferencias estadísticas entre los dos grupos ( $p=0,119$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

El tiempo medio de supervivencia en individuos con COX-2(+) fue de 37,6 meses (Intervalo de Confianza 95%, 31,4-43,9 meses). Para los individuos con COX-2(-) el tiempo medio de supervivencia fue de 44,9 meses (Intervalo de Confianza 95%, 39,4-50,4 meses).

**Figura 4.5.4.- COX-2 y supervivencia**



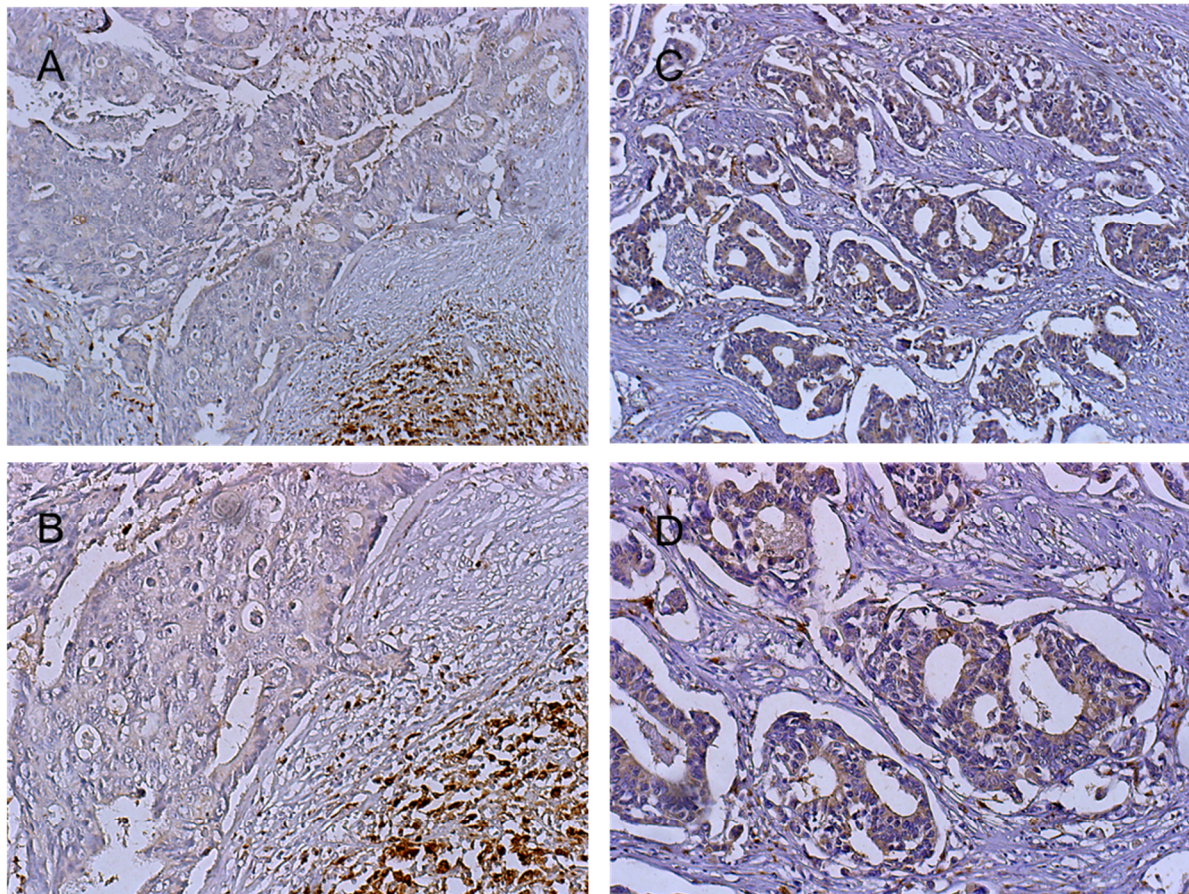
## 4.6.- IGF-1R

### 4.6.1.- Expresión de IGF-1R

Encontramos inmunorreactividad positiva de IGF-1R en la zona membranosa de las células epiteliales tumorales, con una pequeña señal citoplasmática. También se pudo observar en células epiteliales normales y del estroma. Se advirtió expresión indirecta de IGF-1R en células pertenecientes al infiltrado inflamatorio del tumor.

Tras la evaluación *de visu*, el porcentaje de positividad de expresión de IGF-1R (+), en nuestras muestras, fue del 40% (n=36), mientras que el resto, 60% (n=54) se consideró IGF-1R (-) (Figura 4.6.1.1).

**Figura 4.6.1.1.- Expresión de IGF-1R en células epiteliales tumorales**



A. Expresión negativa de IGF-1R en neoplasia de colon (x100). B. Expresión negativa de IGF-1R en neoplasia de colon (x200). Nótese la expresión positiva del infiltrado linfocitario C. Expresión positiva de IGF-1R en neoplasia de colon (x100). D. Expresión positiva de IGF-1R en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico. La tinción membranosa indica la especificidad del anticuerpo por la subunidad  $\alpha$  del receptor. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

En el análisis de imagen, la media de intensidad obtenida fue de  $34,15 \pm 11,3$ , con unos valores comprendidos entre 22,5 y 57,2. Las muestras IGF-1R(+), presentaron una media de expresión de  $47,2 \pm 5,4$ , mientras que las IGF-1R(-) presentaron una intensidad media de  $25,4 \pm 1,8$ .

Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación, no se encontraron valores discordantes entre ambos métodos, obteniendo un valor de correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.6.1.2).

**Figura 4.6.1.2.- Intensidad Expresión IGF-1R**

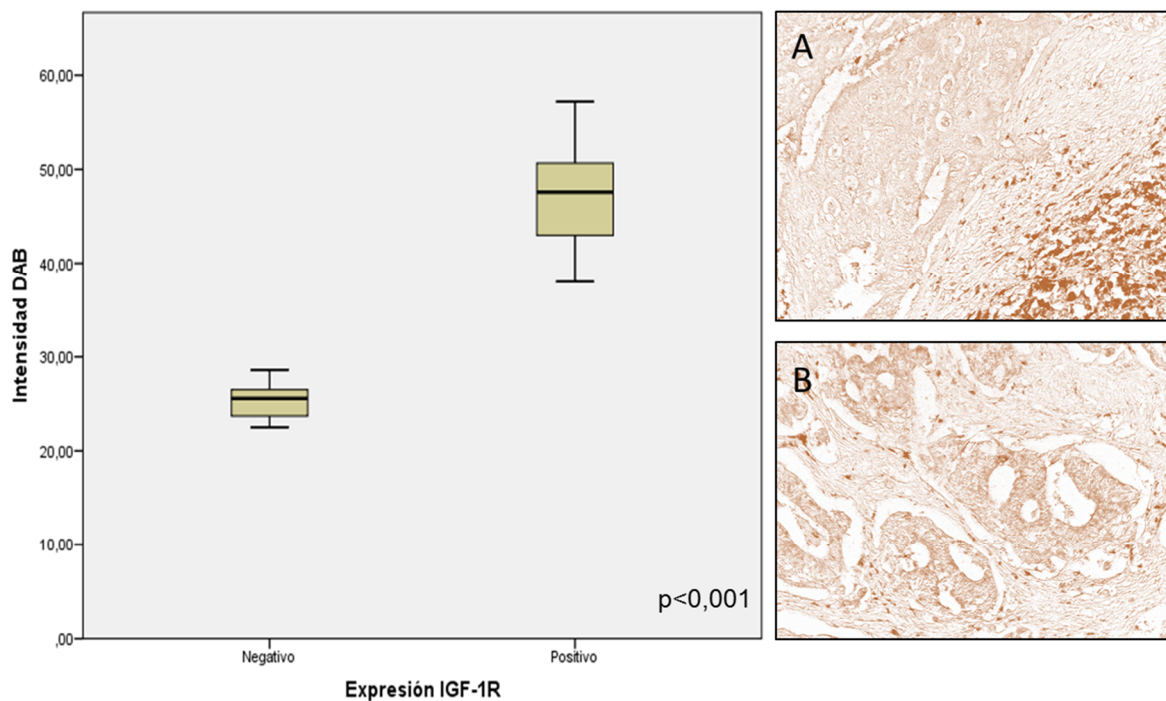


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión negativa de IGF-1R en neoplasia de colon. B. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión positiva de IGF-1R en neoplasia de colon.



#### 4.6.2.- Correlación de la expresión de IGF-1R y los parámetros clínico-patológicos

En la Tabla 4.6.2 se muestra la asociación entre la expresión de IGF-1R y los parámetros clínico-patológicos.

La sobreexpresión del receptor de IGF-1, no se relacionó estadísticamente con la edad y el sexo de los individuos de la muestra.

El tamaño del tumor se vinculó con la mayor expresión de IGF-1R ( $p=0,03$ ), los pacientes con IGF-1R(+), presentaron un diámetro de neoplasia superior a aquellos con IGF-1R(-).

Aquellos individuos con menor señal detectable de esta proteína, tuvieron una probabilidad menor de presentar estenosis asociada a la enfermedad ( $p=0,008$ ). Aunque como en otros casos no se asoció a la distribución anatómica de la misma.

Los tumores con mayor grado de diferenciación tuvieron una escasa inmunorreactividad de IGF-1R ( $p=0,002$ ). Por otra parte, no se apreció una mayor manifestación de infiltrado inflamatorio en las lesiones que sobreexpresaron IGF-1R.

Respecto al estadio de los enfermos, la mayor señal de IGF-1R en la neoplasia se vinculó con una mayor penetrancia de la misma en capas profundas del endotelio intestinal ( $p=0,026$ ), mayor invasión de ganglio linfáticos adyacentes ( $p<0,001$ ) y por tanto un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p<0,001$ ).

Los valores de CEA preoperatorios anormales ( $\geq 5 \mu\text{g/L}$ ), no se vincularon a la expresión de IGF-1R ( $p=0,939$ ), aunque los niveles medios circulantes de CEA fueron superiores en tumores que sobreexpresaron IGF-1R. Cuando se hizo el seguimiento de los pacientes, el antígeno carcinoembrionario presentó unos valores medios superiores en aquellas neoplasias IGF-1R(+) ( $p=0,025$ ). En este caso si observamos diferencias entre grupos respecto a los valores catalogados como normales de CEA ( $p=0,016$ ).

**Tabla 4.6.2.- IGF-1R y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Expresión IGF-1R		Valor p
		Negativo	Positivo	
Casos	90	54	36	
Intensidad Expresión	90	25,45 ± 1,8	47,2 ± 5,4	<0,001 <sup>c</sup>
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		24	23	
Mujer		30	13	0,07 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	64,5 ± 9,7 (47-89)	65,2 ± 11,4 (27-91)	0,77 <sup>b</sup>
< 65	45	30	15	
≥ 65	45	24	21	0,197 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,58 ± 1,7 (1,5-8,1)	5,3 ± 1,8 (2,2-8,5)	0,03 <sup>c</sup>
Estenosis				
No	43	32	11	
Si	47	22	25	0,008 <sup>a</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	34	22	
Der. Áng. Esplénico	34	20	14	0,86 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	5	13	
Diferenciado	72	51	21	0,002 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	22	21	
Ausencia	47	32	15	0,102 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	10	1	
Si	79	44	35	0,026 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	53	4	
Si	33	1	32	<0,001 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	43	7	
III-IV	40	11	29	<0,001 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)	24	35 ± 54 (1-150)	77,7 ± 270 (1,1-1124)	1,00 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	7	3	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	10	4	0,939 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	47,9 ± 184,5 (0,7-1124)	71,7 ± 230,9 (1-1362)	0,025 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l		35	14	
Anormales ≥ 5 µg/l		19	22	0,016 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

b t-Student

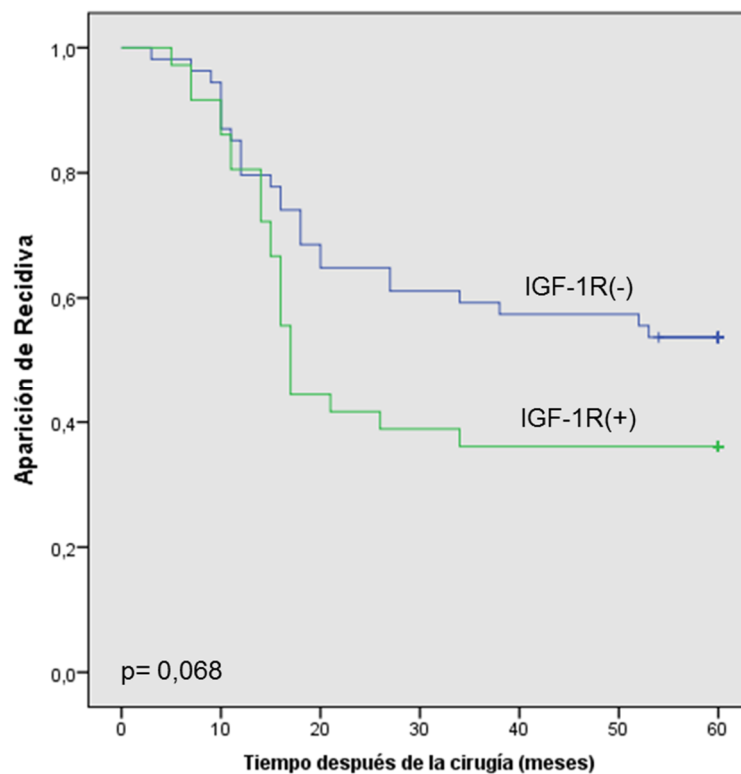
c U de Mann-Whitney

#### 4.6.3.- Correlación de la expresión de IGF-1R y aparición de recidiva

Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la recurrencia de la enfermedad y las relacionamos con la expresión de IGF-1R.

Las curvas de aparición de recidiva respecto a la expresión de IGF-1R se muestran en la Figura 4.6.3. El tiempo medio de recurrencia para individuos con baja expresión de IGF-1R (IGF-1R(-)), fue de 41 meses (Intervalo de Confianza 95%, 35,2-47 meses). Para los individuos con elevada expresión de IGF-1R (IGF-1R (+)), el tiempo medio correspondió a 31 meses (Intervalo de Confianza 95%, 24-38,5 meses). No hubo una diferencias de expresión de IGF-1R entre grupos (negativo vs. positivo), para que fuera un factor predictor de la recidiva en el tiempo ( $p=0,068$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox). No podemos descartar, que este valor se deba al tamaño muestral, observándose una tendencia asociativa entre los valores.

**Figura 4.6.3.- IGF-1R y recidiva**



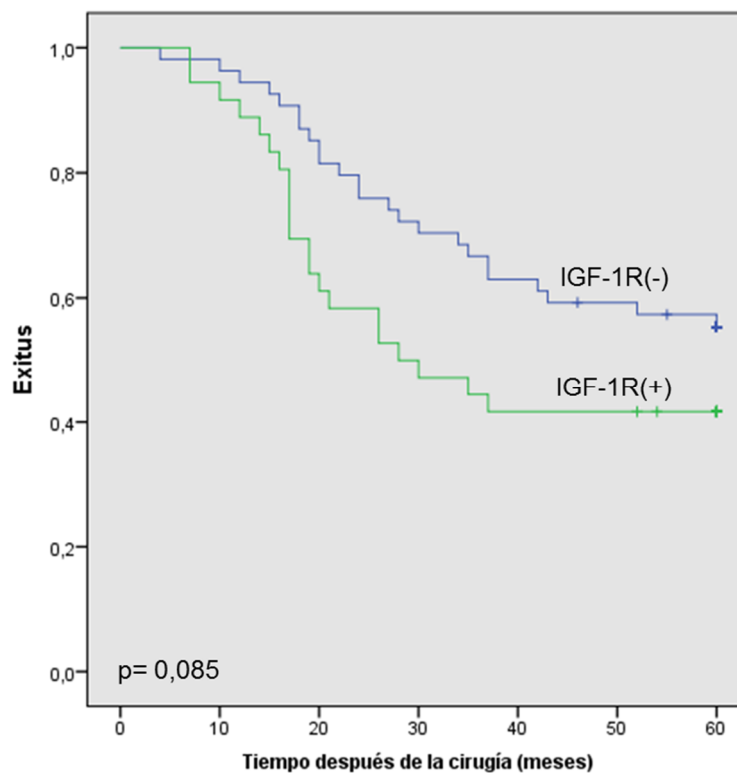
#### 4.6.4.- IGF-1R y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la expresión de IGF-1R se muestran en la Figura 4.6.4.

La expresión de IGF-1R en la neoplasia primaria, no presentó una correlación con la supervivencia de los pacientes, no se llegó a encontrar diferencias estadísticas entre los dos grupos ( $p=0,085$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox). Aunque conociendo el valor del estadístico, parece haber una tendencia asociativa, que se podría confirmar aumentando el tamaño muestral.

El tiempo medio de supervivencia en individuos con IGF-1R(+) fue de 36,4 meses (Intervalo de Confianza 95%, 29,6-43,2 meses). Para los individuos con IGF-1R(-) el tiempo medio de supervivencia fue de 45,3 meses (Intervalo de Confianza 95%, 40,2-50,4 meses).

Figura 4.6.4.- IGF-1R y supervivencia



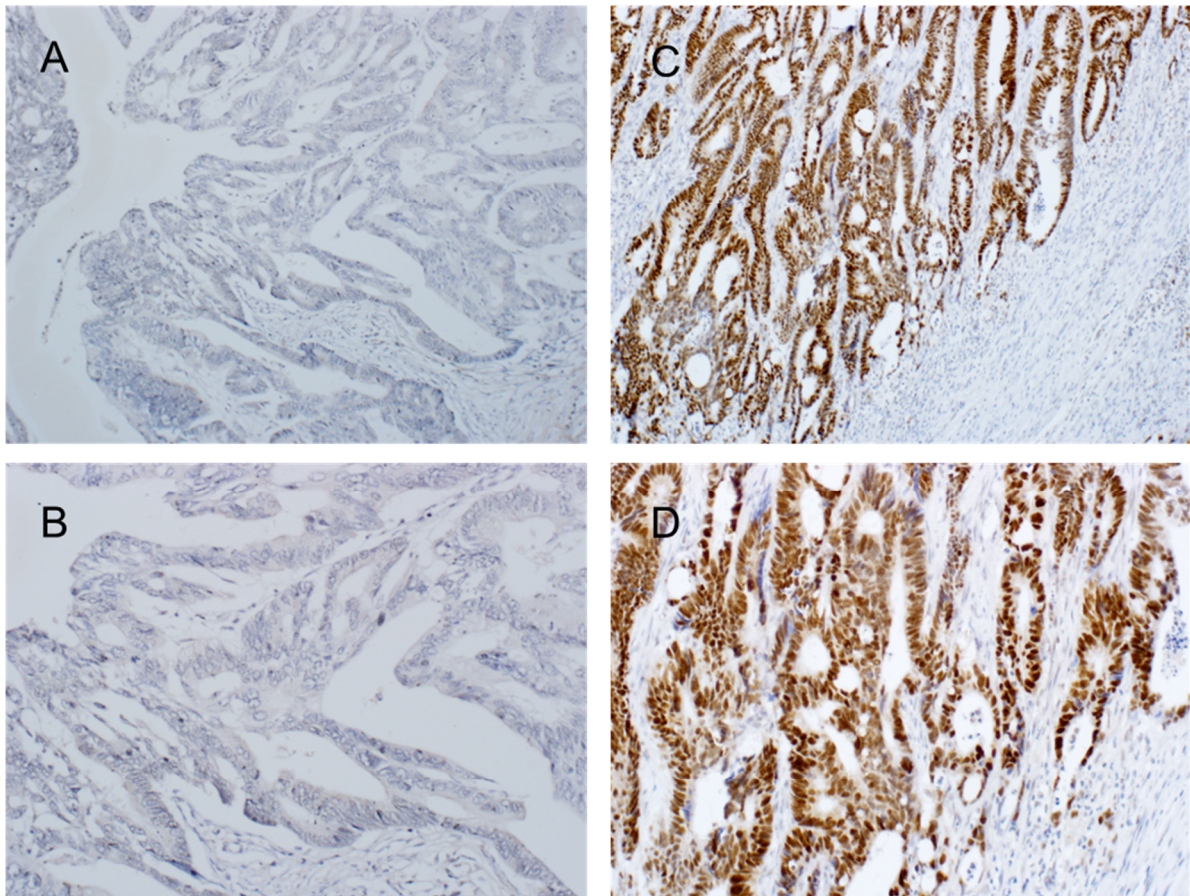


## 4.7.- p73

### 4.7.1.- Expresión de p73

La tinción con anticuerpo p73, produjo una señal de color marrón oscuro, asociada al área nuclear de las células, de grado y distribución heterogénea. La intensidad de la reacción se acrecentó desde la transición entre el epitelio intestinal normal hasta el tejido tumoral, haciéndose especialmente visible en el frente de invasión de la matriz extracelular (Figura 4.7.1.1).

**Figura 4.7.1.1.- Expresión de p73 en células epiteliales tumorales**



A. Expresión negativa de p73 en neoplasia de colon (x100). B. Expresión negativa de p73 en neoplasia de colon (x200). C. Expresión positiva de p73 en neoplasia de colon (x100). D. Expresión positiva de p73 en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

Para el análisis de expresión de p73, se calculó la relación porcentual entre células tumorales p73 inmunorreactivas y células tumorales totales.

La media porcentual de expresión de p73 en la muestra fue del  $37 \pm 30\%$  (0%-100%), mientras que la mediana de la distribución fue del 30% (10%-51%) (P25-P75).

Aquellos tumores con un índice de p73  $<30\%$ , fueron clasificados como p73(-), los tumores que superaron este porcentaje de señal se consideraron p73(+). (Figura 4.7.1.2).

Tras la evaluación por análisis de imagen, el porcentaje de muestras tumorales con expresión positiva de p73 fue del 59% (n=53), mientras que el resto, 41% (n=37), se consideró p73 negativo.

Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación, no se encontraron valores discordantes entre ambos métodos, obteniendo un valor de correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

**Figura 4.7.1.2.- Expresión p73**

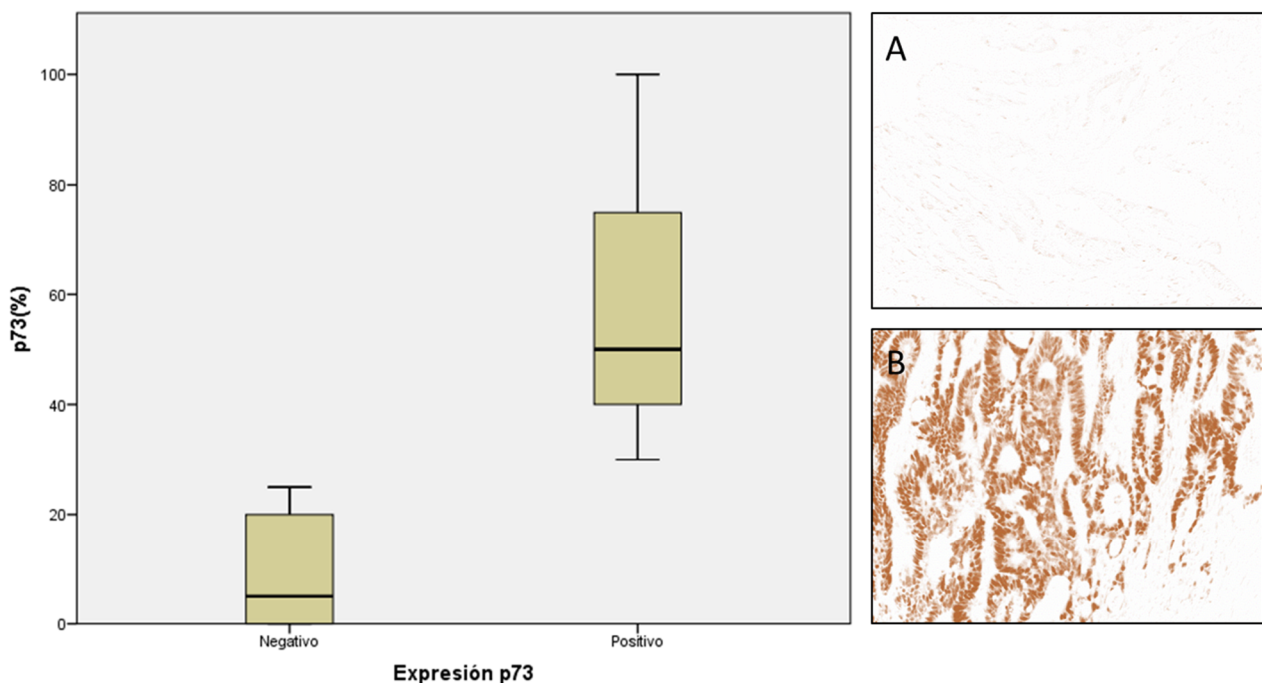


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión negativa de p73 en neoplasia de colon. B. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión positiva de p73 en neoplasia de colon.

#### **4.7.2.- Correlación de la expresión de p73 y los parámetros clínico-patológicos**

En la Tabla 4.7.2 se muestra la asociación entre la expresión de p73 en la neoplasia primaria y los parámetros clínico-patológicos.

La sobreexpresión de p73 no se relacionó con la edad ni el sexo de los individuos del estudio.

No se encontró una correspondencia entre p73 y el tamaño tumoral, la dimensión de los tumores se distribuyó de forma parecida entre los distintos grupos.

Se advirtió una tendencia asociativa entre la expresión de p73 y el debut de la enfermedad como obstrucción intestinal, con una significancia de  $p=0,002$ . Aquellos tumores con sobreexpresión de p73, tuvieron una probabilidad mayor de presentar obstrucción asociada al cáncer colorrectal. Aunque no hubo grandes diferencias en la localización anatómica de la neoplasia, se observaron un mayor número ubicadas a partir del ángulo esplénico.

No hubo divergencias de expresión respecto al grado de diferenciación histológico del tumor así como al infiltrado linfocitario presente en las neoplasias.

Las neoplasias con mayor manifestación de p73, presentaron un grado de penetración en la pared intestinal superior ( $p=0,023$ ), invadiendo la capa serosa en la mayoría de los casos. También se asoció al compromiso ganglionar ( $p<0,042$ ), aquellos tumores con p73(+) presentaron una probabilidad mayor de invasión en ganglios linfáticos. Aunque se observó una tendencia asociativa entre un estadio más avanzado de la enfermedad y la sobreexpresión de p73, esta no llegó a ser significativa entre los dos grupos ( $p=0,055$ ).

Los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), tanto pre como postoperatorios, no parecen estar asociados con la mayor inmunorreactividad de p73 en los tumores. Aunque se observa niveles medios de CEA superiores en tumores p73(+), no aparecen diferencias estadísticas entre grupos.

**Tabla 4.7.2.- p73 y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Expresión p73		Valor p
		Negativo	Positivo	
Casos	90	37	53	
Expresión p73 % (rango)	90	9 ± 9 (0-25)	57 ± 22 (30-100)	<0,001 <sup>c</sup>
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		16	31	
Mujer		21	22	0,154 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	66 ± 10 (47-89)	64 ± 10 (27-91)	0,355 <sup>b</sup>
< 65	45	19	26	
≥ 65	45	18	27	0,830 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,5 ± 1,9 (1,5-8,1)	5,1 ± 1,7 (2-8,5)	0,102 <sup>c</sup>
Estenosis				
No	43	25	18	
Si	47	12	35	0,002 <sup>a</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	21	35	
Der. Áng. Esplénico	34	16	18	0,372 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	8	10	
Diferenciado	72	29	43	0,748 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	17	26	
Ausencia	47	20	27	0,771 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	8	3	
Si	79	29	50	0,023 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	28	29	
Si	33	9	24	0,042 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	25	25	
III-IV	40	13	28	0,055 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)	24	20,9 ± 349 (1-150)	173 ± 419 (1,1-1124)	0,534 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	2	8	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	5	9	0,404 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	45,2 ± 187,3 (0,9-1124)	66 ± 215 (0,7-1362)	0,116 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	49	22	27	
Anormales ≥ 5 µg/l	41	15	26	0,425 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

b t-Student

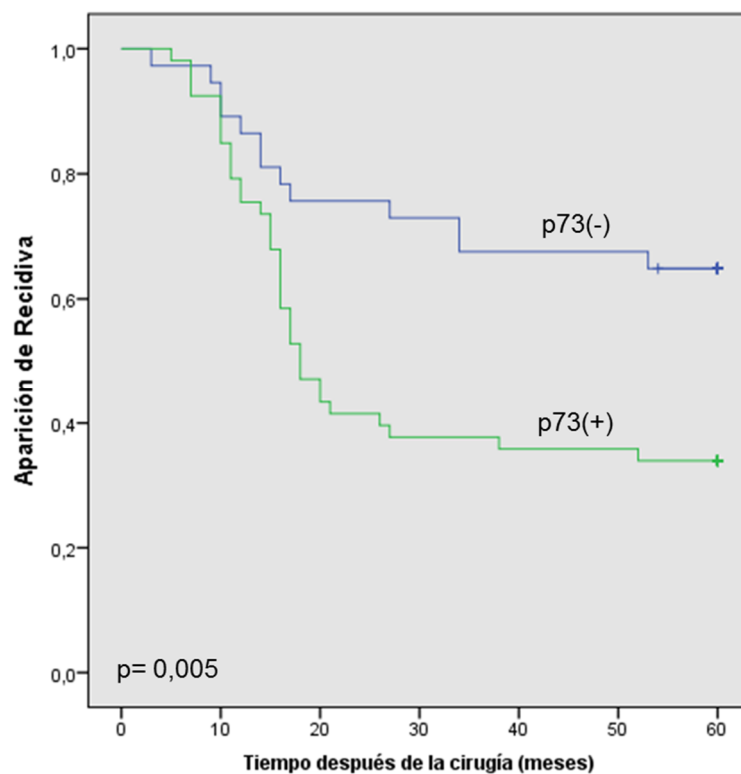
c U de Mann-Whitney

#### 4.7.3.- Correlación de la expresión de p73 y aparición de recidiva

Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la recurrencia de la enfermedad y las relacionamos con la expresión de p73. Las curvas de aparición de recidiva respecto a la expresión de p73 se muestran en la Figura 4.7.3.

El tiempo medio de recurrencia para individuos con baja expresión de p73 (p73(-)), fue de 45,7 meses (Intervalo de Confianza 95%, 39-52,5). Para los individuos con elevada expresión de p73 (p73(+)), el tiempo medio correspondió a 31,1 meses (Intervalo de Confianza 95%, 25,2-37 meses). Encontramos una diferencia significativa entre la expresión de p73 (p73<30% vs. P73>30%) en la neoplasia primaria y la recidiva en el tiempo ( $p=0,005$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

**Figura 4.7.3.- p73 y recidiva**



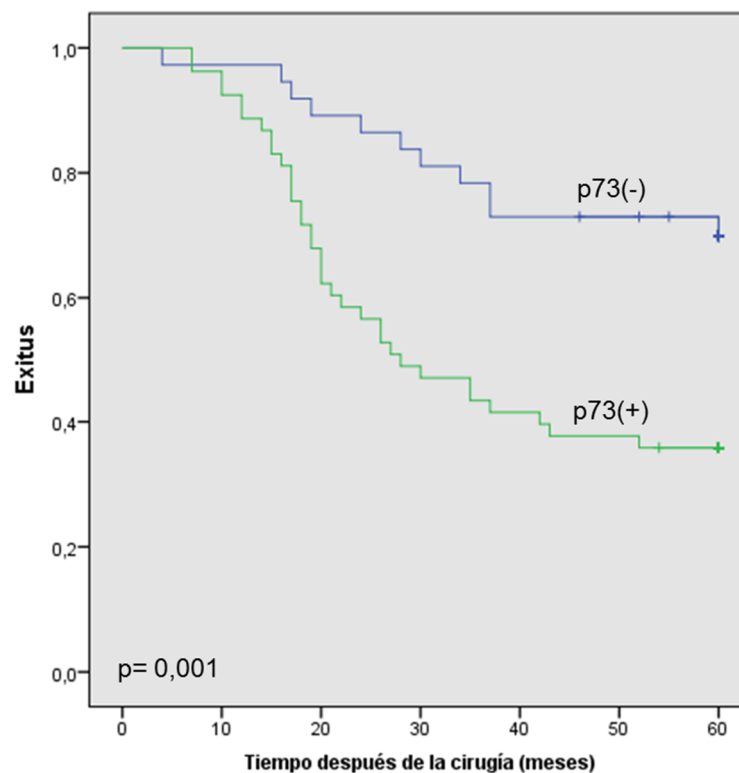
#### 4.7.4.- p73 y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la expresión de p73 se muestran en la Figura 4.7.4.

El porcentaje de expresión de p73 en la neoplasia primaria, parece ser un importante factor pronóstico respecto a la supervivencia, con una significación estadística ( $p=0,001$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

El tiempo medio de supervivencia en individuos con p73(+) fue de 35,7 meses (Intervalo de Confianza 95%, 30,3-41 meses). Para los individuos con p73(-) el tiempo medio de supervivencia fue de 50,4 meses (Intervalo de Confianza 95%, 44,8-56 meses).

**Figura 4.7.4.- p73 y supervivencia**



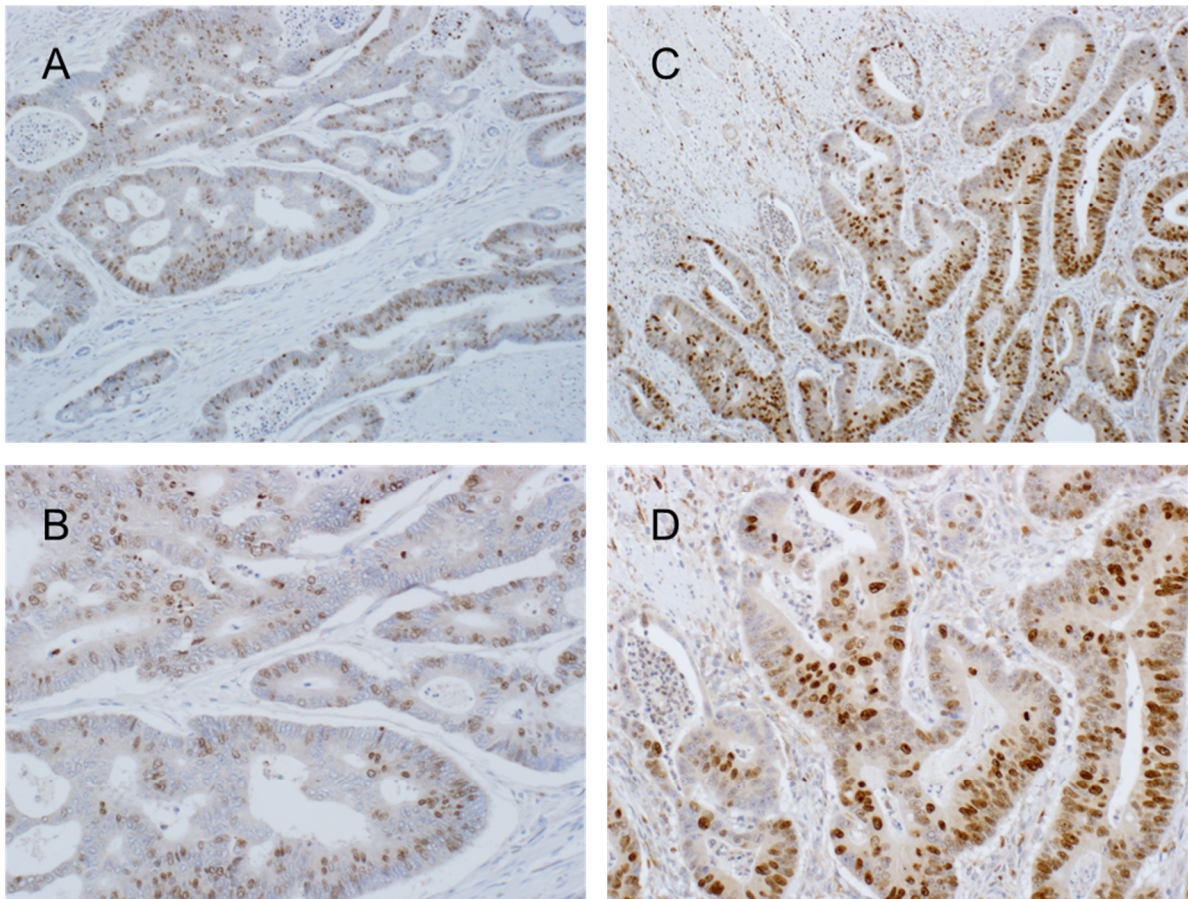


## 4.8.- Ki-67 (ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN-IP)

### 4.8.1.- Expresión de Ki-67

La inmunotinción con el anticuerpo MIB-1, produjo una señal nuclear de color marrón difusa, más acentuada en el nucléolo, con una relativa uniformidad en la intensidad. Se diferenció fácilmente las células tumorales Ki-67(+), de las células normales del estroma que presentaron inmunorreactividad, como el infiltrado linfocitario asociado a la inflamación (Figura 4.8.1.1).

**Figura 4.8.1.1.- Expresión de Ki-67 en células epiteliales tumorales**



A. Expresión negativa de Ki-67 en neoplasia de colon (x100). B. Expresión negativa de Ki-67 en neoplasia de colon (x200). C. Expresión positiva de Ki-67 en neoplasia de colon (x100). D. Expresión positiva de Ki-67 en neoplasia de colon (x200). La expresión aparece en color marrón desarrollado por la 3,3'-Diaminobenzidina tetrahydroclorhídrico. Las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina.

Para el análisis del índice de proliferación celular (inmunotinción Ki-67-MIB-1), se calculó la relación porcentual entre células tumorales Ki-67(+) y células tumorales totales.

La media porcentual de expresión de Ki-67 en la muestra fue del  $56 \pm 24,2\%$  (11%-92%), mientras que la mediana de la distribución fue del 66% (33%-78%) (P25-P75).

Los pacientes fueron divididos en dos grupos acordes a los valores de los porcentajes del índice de proliferación, aquellos cuyo IP fue  $<66\%$ , se clasificaron como Ki-67(-), y los tumores con IP  $>66\%$ , se consideraron Ki-67(+).

Tras la evaluación por análisis de imagen, el porcentaje de muestras tumorales con expresión positiva de Ki-67 fue del 55,6% (n=50), mientras que el resto, 44,4% (n=40), se consideró Ki-67 negativo. Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación, no se encontraron valores discordantes entre ambos métodos, obteniendo un valor de correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.8.1.2).

**Figura 4.8.1.2.- Índice de Proliferación**

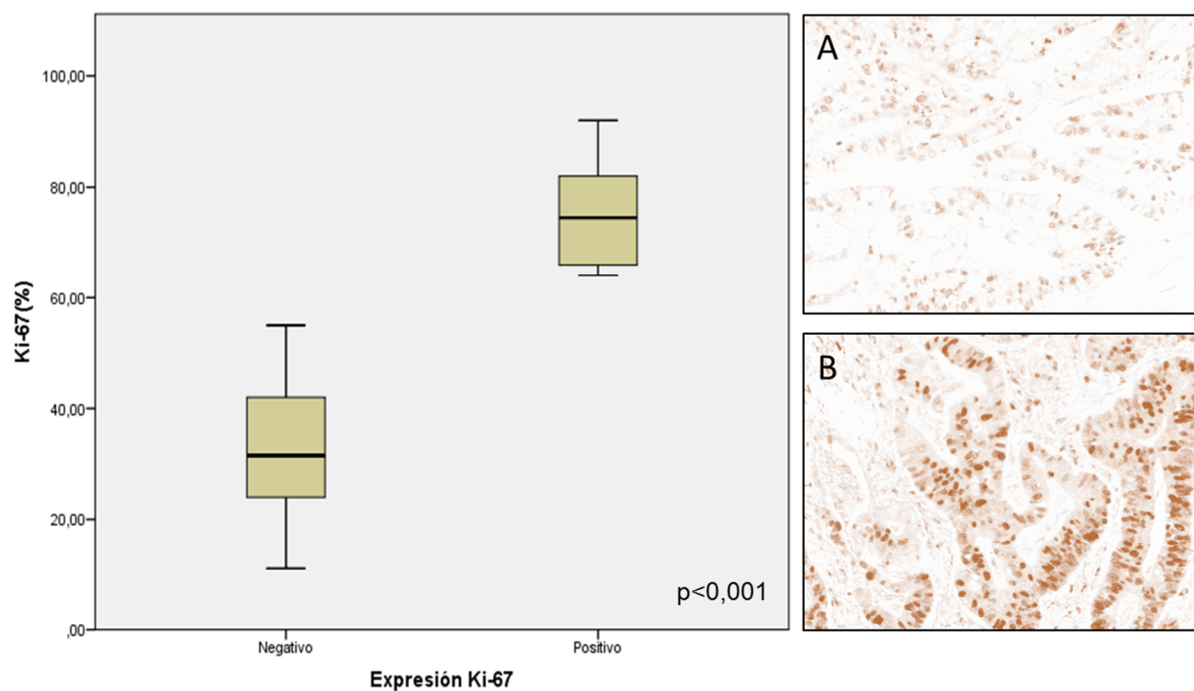


Imagen procesada por el programa ImageJ, plugin color deconvolution (H-DAB) (200X). A. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión negativa de Ki-67 en neoplasia de colon. B. Señal de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) de la muestra sin mezclar, expresión positiva de Ki-67 en neoplasia de colon.



#### 4.8.2.- Correlación del índice de proliferación y los parámetros clínico-patológicos

En la Tabla 4.8.2 se muestra la asociación entre el índice de proliferación y los parámetros clínico-patológicos. El índice de proliferación celular no se relacionó con la edad ni el sexo de los individuos del estudio. De hecho, hubo una distribución equivalente respecto a la expresión de Ki-67, en personas con edades por encima y debajo de 65 años. Se encontró una correspondencia con el tamaño tumoral ( $p=0,005$ ), la dimensión de los tumores fue mayor en aquellas neoplasias con un IP mayor, con un tamaño medio de  $5,4 \pm 1,8$  cm. El diámetro medio de aquellas piezas operatorias cuya expresión de Ki-67 fue negativa, fue de  $4,3 \pm 1,6$ .

Del mismo modo, advertimos una tendencia asociativa entre la expresión de Ki-67 y el debut de la enfermedad como obstrucción intestinal, con una significancia de  $p=0,012$ . Aquellos individuos cuyo índice de proliferación estuvo por encima del 66%, tuvieron una probabilidad mayor de presentar obstrucción asociada al cáncer colorrectal.

Aunque hubo una tendencia entre la localización de la neoplasia en el tramo distal del colon y un índice de proliferación mayor, esta no llegó a ser significativa. Lo mismo pasó con el grado de diferenciación histológico, aunque una gran parte de los tumores indiferenciados tuvieron una expresión mayor de Ki-67, esta no llegó a ser lo suficientemente grande como para encontrar divergencias estadísticas. No se observó una correlación entre el índice de proliferación y el infiltrado linfocitario correspondiente ( $p=0,186$ ). Las neoplasias con mayor manifestación de Ki-67, presentaron un grado de penetración en la pared intestinal superior ( $p=0,008$ ), invadiendo la capa serosa en la mayoría de los casos. También se asoció al compromiso ganglionar ( $p<0,001$ ), aquellos tumores con un IP menor presentaron una probabilidad menor de invasión en ganglios linfáticos. Por ende, se asoció un índice de proliferación elevado con un estadio TNM avanzado (III-IV) ( $p<0,001$ ). Los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), tanto pre como postoperatorios, no parecen estar asociados con la expresión de Ki-67, no apareciendo diferencias estadísticas apreciables entre grupos.

**Tabla 4.8.2.- Ki-67 y variables clínico-patológicas**

Parámetros Clínico-Patológicos	Nº Casos	Expresión Ki-67		Valor p
		Negativo	Positivo	
Casos	90	40	50	
Índice de Proliferación % (rango)	90	32,4 ± 12 (11-55)	76 ± 9 (66-90)	<0,001 <sup>c</sup>
Sex ratio (M/F)	47/43			
Hombre		21	26	
Mujer		19	24	0,962 <sup>a</sup>
Media Edad (rango, años)	90	65 ± 8,9 (47-89)	64,7 ± 11,2 (27-91)	0,873 <sup>b</sup>
< 65	45	20	25	
≥ 65	45	20	25	1,00 <sup>a</sup>
Tamaño tumoral, media en cm (rango)		4,3 ± 1,6 (1,5-8,1)	5,4 ± 1,8 (2,2-8,5)	0,005 <sup>c</sup>
Estenosis				
No	43	25	18	
Si	47	15	32	0,012 <sup>a</sup>
Localización Neoplasia				
Izq. Áng. Esplénico	56	24	32	
Der. Áng. Esplénico	34	16	18	0,697 <sup>a</sup>
Grad. Difer. Histológico				
Indiferenciado	18	5	13	
Diferenciado	72	35	37	0,112 <sup>a</sup>
Infiltrado Linfocitario				
Presencia	43	16	27	
Ausencia	47	24	23	0,186 <sup>a</sup>
Invasión Serosa				
No	11	9	2	
Si	79	31	48	0,008 <sup>a</sup>
Invasión Linfática				
No	57	36	21	
Si	33	4	29	<0,001 <sup>a</sup>
Estadio TNM				
I-II	50	32	18	
III-IV	40	8	32	<0,001 <sup>a</sup>
CEA pre-operatorio (rango)	24	12,6 ± 26 (1,1-101)	139 ± 349 (1-1124)	0,172 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l	10	7	3	
Anormales ≥ 5 µg/l	14	7	7	0,327 <sup>a</sup>
CEA post-operatorio (rango)	90	36,28 ± 125,7 (0,7-742)	74,3 ± 249 (0,7-1362)	0,278 <sup>c</sup>
Normales < 5 µg/l		25	24	
Anormales ≥ 5 µg/l		15	26	0,170 <sup>a</sup>

a Test de X<sup>2</sup>

b t-Student

c U de Mann-Whitney

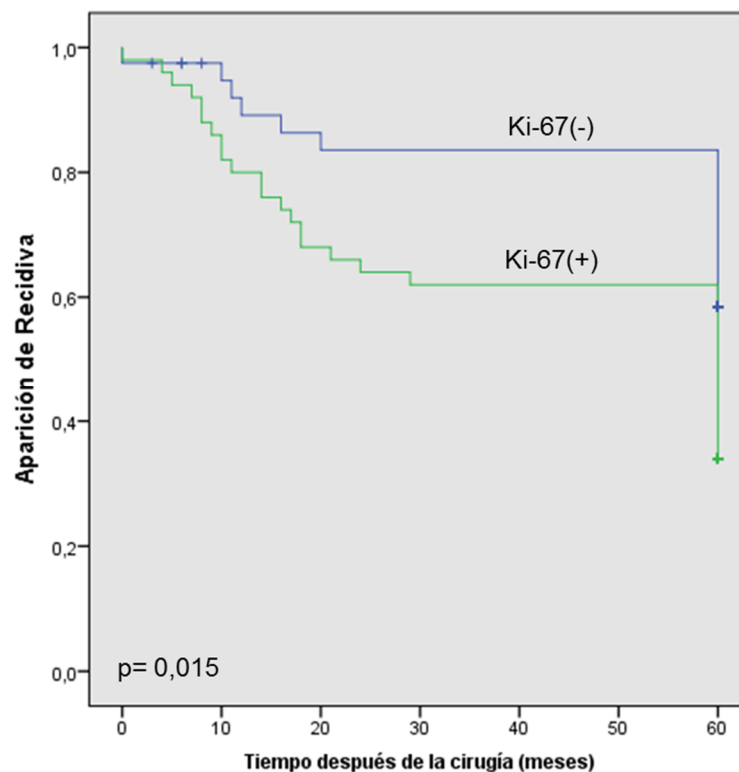
#### 4.8.3.- Correlación entre el índice de proliferación y la aparición de recidiva

Tras la resección de la neoplasia primaria y en el seguimiento de los pacientes, evaluamos la recurrencia de la enfermedad y las relacionamos con el IP.

Las curvas de aparición de recidiva respecto a la expresión de Ki-67 se muestran en la Figura 4.8.3.

El tiempo medio de recurrencia para individuos índice de proliferación bajo (Ki-67(-)), fue de 52 meses (Intervalo de Confianza 95%, 46-58). Para los individuos con elevada expresión de Ki-67 (Ki-67(+)), el tiempo medio correspondió a 42 meses (Intervalo de Confianza 95%, 35-48 meses). Encontramos una diferencia significativa entre la expresión de Ki-67 (IP<66% vs. IP>66%) en la neoplasia primaria y la recidiva en el tiempo ( $p=0,015$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

**Figura 4.8.3.- Ki-67 y recidiva**



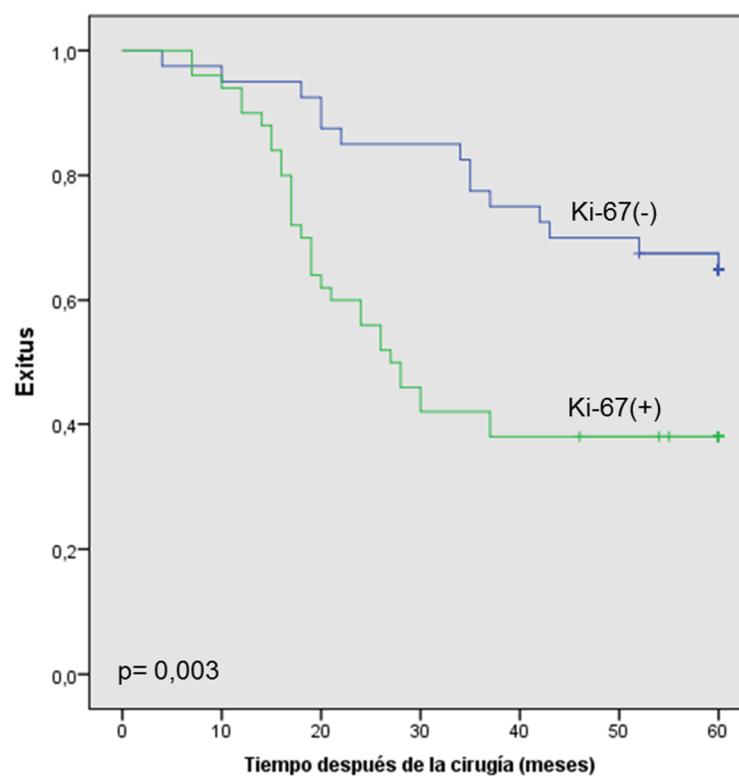
#### 4.8.4.- Índice de proliferación y supervivencia

Las curvas de supervivencia respecto a la expresión de Ki-67 se muestran en la Figura 4.8.4.

El índice de proliferación en la neoplasia primaria, parece ser un importante factor pronóstico respecto a la supervivencia, con una significación estadística ( $p=0,003$ ) (test de rango logarítmico de Mantel-Cox).

El tiempo medio de supervivencia en individuos con Ki-67(+) fue de 35,3 meses (Intervalo de Confianza 95%, 29,7-41 meses). Para los individuos con Ki-67(-) el tiempo medio de supervivencia fue de 49,8 meses (Intervalo de Confianza 95%, 44,5-55,1 meses).

**Figura 4.8.4.- Ki-67 y supervivencia**

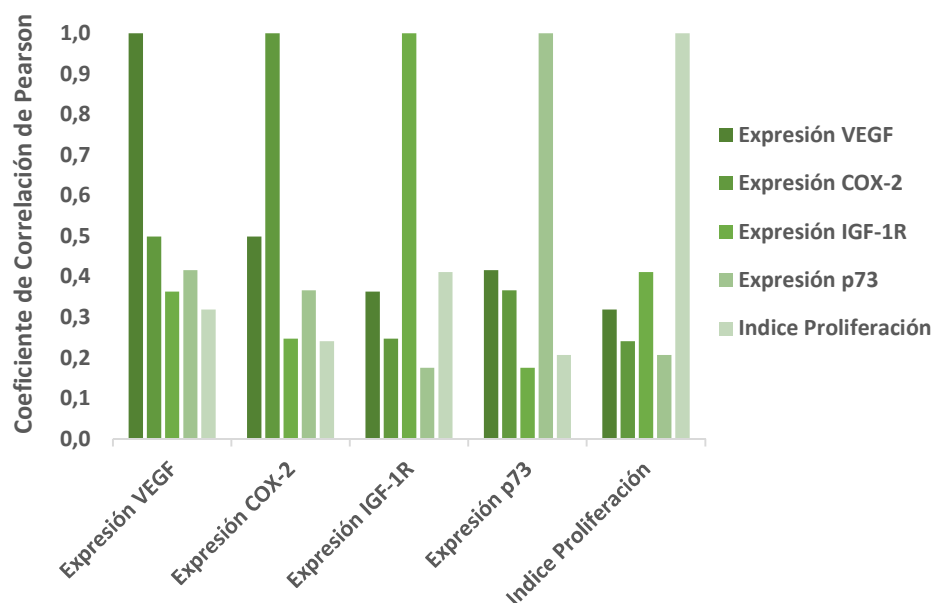


#### 4.9.- COEXPRESIÓN VEGF, COX-2, IGF-1R, p73, Ki-67

Una vez obtenidos los niveles de expresión de las distintas proteínas en la neoplasia primaria, enfrentamos los valores de cada grupo para averiguar el grado de coexpresión (Tabla 4.9).

Al tratarse de variables dicotómicas, el índice estadístico utilizado fue la  $\chi^2$  de Pearson y su correspondiente coeficiente de correlación *phi* ( $\phi$ ). Seguimos las normas interpretativas sugeridas por <sup>129</sup>, a la hora de evaluar la intensidad de la asociación, para este coeficiente (Figura 4.9).

**Figura 4.9.- Coexpresión proteínas en la neoplasia primaria de los pacientes**



$\phi$  Relación del coeficiente de correlación de Pearson  
 $\phi \leq 0,3$  Nivel bajo asociación.  
 $0,3 < \phi < 0,5$  Nivel medio asociación.  
 $\phi \geq 0,5$  Nivel alto asociación.

En el análisis de correlaciones bivariado, observamos una correspondencia estadísticamente significativa en los niveles de coexpresión de los distintos factores estudiados, a excepción de los casos IGF-1R-p73 y Ki-67-p73, aunque sus valores fueron muy próximos al nivel de significancia marcado.

Si bien todas las correlaciones fueron positivas ( $\phi > 0$ ), sólo la coexpresión de VEGF-COX-2 tuvo un nivel alto de asociación. Para la coexpresión de VEGF-IGF-1R; VEGF-p73; VEGF-Ki-67; COX-2-p73; IGF-1R-Ki-67 les correspondió un nivel medio. Y en las restantes un nivel bajo.

**Tabla 4.9.- Coexpresión de VEGF, COX-2, IGF-1R, p73, Ki-67**

	Expresión VEGF				Expresión COX-2				Expresión IGF-1R				Expresión p73			
	Negativo	Positivo	Valor p	$\phi$	Negativo	Positivo	Valor p	$\phi$	Negativo	Positivo	Valor p	$\phi$	Negativo	Positivo	Valor p	$\phi$
Expresión VEGF																
Negativo																
Positivo																
Expresión COX-2																
Negativo	44	7														
Positivo	15	24	<0,001 <sup>a</sup>	0,511												
Expresión IGF-1R																
Negativo	43	11			36	18										
Positivo	16	20	0,001 <sup>a</sup>	0,363	15	21	0,019 <sup>a</sup>	0,247								
Expresión p73																
Negativo	33	4			29	8			26	11						
Positivo	26	27	<0,001 <sup>a</sup>	0,416	22	31	<0,001 <sup>a</sup>	0,366	28	25	0,097 <sup>a</sup>	0,175				
Índice Proliferación																
Negativo	33	7			28	12			33	7			21	19		
Positivo	26	24	0,002 <sup>a</sup>	0,319	23	27	0,022 <sup>a</sup>	0,241	21	29	<0,001 <sup>a</sup>	0,411	16	34	0,05 <sup>a</sup>	0,207

<sup>a</sup> Test X<sup>2</sup>

$\phi$  Coeficiente *phi* de Pearson

## 4.10.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE

### 4.10.1.- Estenosis

Para el análisis multivariante de la estenosis, utilizamos el modelo de regresión logística binaria, donde la variable dependiente fue la presencia de obstrucción intestinal como debut del CCR, y las variables predictoras fueron la expresión de VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 y Ki-67.

**Tabla 4.10.1.- Regresión Logística Binaria de la Estenosis con los factores pronósticos**

Factor	Coeficiente de Regresión	SE	Odds Ratio	95% IC	Valor p <sup>a</sup>
VEGF	0,96	0,632	0,908	0,858-3,133	0,879
Índice de proliferación	0,521	0,512	1,684	0,954-4,597	0,309
COX-2	0,991	0,5	2,694	1,012-7,174	0,04
p73	1,01	0,496	2,746	1,039-7,259	0,042
IGF-1R	0,921	0,422	2,511	1,059-6,574	0,048

Prueba de Hosmer-Lemeshow, p=269

SE Error estándar

IC Intervalo de Confianza

a Regresión Logística Binaria

Tras el examen, las variables VEGF y el Índice de Proliferación, se retiraron del modelo (no tuvieron un valor significativo en el mismo). Podemos indicar, que aunque en el estudio univariante de la expresión de estas proteínas en la neoplasia primaria tuvieron una relación estadística con la estenosis, en el análisis multivariante no actuaron de modo predictor.

Según nuestro modelo, podemos sugerir que la sobreexpresión de COX-2, p73 e IGF-1R en el tumor, aumenta la probabilidad de que el CCR debute como obstrucción intestinal en casi tres veces comparado con aquellos tumores que no las sobreexpresan.



#### 4.10.2.- Recidiva y Supervivencia

Para el análisis multivariante de la recidiva de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes, con el modelo de riesgos proporcionales de COX, elegimos todos los factores clínico-patológicos que fueron estadísticamente significativos en los correspondientes análisis univariantes (no se tuvo en cuenta la sobreexpresión de COX-2 e IGF-1R).

El estadio TNM fue omitido de este estudio para evitar un cotejo inexacto debido a la inclusión en la misma prueba de un factor multiparamétrico.

En un primer análisis, para determinar los factores pronósticos independientes, valoramos la relación entre las variables y la aparición de recidiva en el tiempo (Tabla 4.10.2).

**Tabla 4.10.2.- Análisis Multivariante de los factores asociados con la recidiva en CCR**

Factor	Coefficiente de Regresión	SE	Hazard Ratio	95% IC	Valor p <sup>a</sup>
Estenosis	0,447	0,298	1,563	1,05-2,805	0,041
Tamaño tumoral ≥5 cm	0,058	0,079	1,06	0,908-1,237	0,461
Invasión Linfática	0,581	0,289	1,787	1,014-3,15	0,045
CEA Postoperatorio ≥5 µg/l	0,735	0,293	2,086	1,174-3,7	0,012
VEGF	0,782	0,304	2,186	1,2-3,97	0,01
p73	0,697	0,33	2,007	1,05-3,83	0,035
Índice de proliferación	0,554	0,316	1,74	1,01-3,232	0,047

SE Error estándar

IC Intervalo de Confianza

a Regresión COX

El factor predictor más importante sobre la aparición de recidiva local y/o a distancia de los pacientes fue la expresión positiva de VEGF en la neoplasia primaria (HR 2,2), seguidos de la expresión positiva de p73 y valores sanguíneos anormales (≥5µg/l) del antígeno carcinoembrionario.

En cambio en el análisis de riesgos proporcionales, el tamaño tumoral no tuvo una relación estadísticamente significativa con la recurrencia.

Por último, hicimos el análisis multivariante de la relación entre las variables clínico-patológicas con la supervivencia (Tabla 4.10.3).

**Tabla 4.10.3.- Análisis Multivariante de los factores asociados con la supervivencia en CCR**

Factor	Coeficiente de Regresión	SE	Hazard Ratio	95% IC	Valor p <sup>a</sup>
Estenosis	0,65	0,305	1,718	1,12-3,12	0,035
Tamaño tumoral ≥5 cm	0,819	0,333	2,267	1,18-4,36	0,014
Invasión Linfática	1,439	0,724	4,218	1,03-17,43	0,045
CEA Postoperatorio ≥5 µg/l	0,657	0,301	1,928	1,069-3,47	0,029
VEGF	0,78	0,323	2,18	1,16-4,1	0,016
p73	0,822	0,371	2,274	1,1-4,7	0,027
Índice de proliferación	0,842	0,331	2,321	1,21-4,44	0,011

SE Error estándar

IC Intervalo de Confianza

a Regresión COX

Todos los elementos estudiados, fueron factores de riesgo sobre la supervivencia de los pacientes. La combinación entre la invasión linfática (HR 4,2), tamaño tumoral superior a 5 cm (HR 2,3), la elevación anormal de la tasa de CEA circulante (HR 1,9) y la sobreexpresión de los factores examinados en este estudio (HR 2,2), fueron marcadores de alto riesgo, predictores del pronóstico vital de los pacientes.

## **V.- DISCUSIÓN**



El cáncer en general, y el colorrectal en particular, se han revelado como una de las enfermedades más importantes del siglo XX y XXI, cuya incidencia ha ido aumentando en paralelo con el desarrollo de la sociedad y el aumento de la esperanza de vida.

En los últimos años el manejo clínico de los pacientes ha experimentado una evolución importante, introduciéndose grandes avances en lo que a supervivencia y calidad de vida del paciente se refiere. Los conocimientos clínicos, patológicos y moleculares adquiridos han permitido crear clasificaciones pronósticas y predictivas de gran valor para el tratamiento del paciente que nos acercan un poco más hacia el objetivo de una medicina personalizada en la que el abordaje de la enfermedad y los procedimientos a seguir estarán en función de las características individuales de cada paciente y de su tumor.

Pese a todo, en pacientes clasificados dentro de un mismo estadio TNM, sigue existiendo una gran heterogeneidad que impide rentabilizar al máximo las posibilidades terapéuticas disponibles. El estudio de los tumores a nivel molecular parece que se está revelando como una pieza clave para descifrar los mecanismos de desarrollo del cáncer y alcanzar el objetivo de una medicina personalizada en el área de la oncología. El establecimiento de una clasificación de tumores colorrectales en base a sus perfiles de expresión génica y el conocimiento de las rutas moleculares implicadas en los procesos de malignización tal y como se han planteado en nuestro trabajo podrían suponer un avance para el futuro tratamiento de los pacientes.

Esta tesis doctoral se enmarca en la línea de investigación principal del Grupo de Investigación en Cirugía de Urgencias (CTS-440), la cual persigue entender los mecanismos asociados entre la obstrucción intestinal como debut de la neoplasia y la evolución de la enfermedad. Este trabajo presenta un estudio histológico e inmunohistoquímico diferencial realizado a tumores colorrectales estenosantes y no estenosantes. Las consecuencias de la asociación y los mecanismos implicados en la misma, así como su posible utilidad en el seguimiento de los pacientes operados se discuten en los siguientes apartados.

## 5.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y DE LA NEOPLASIA

Como se ha descrito previamente <sup>1</sup> la edad es un factor asociado al riesgo de CCR, pasando la frontera de los 50 años las probabilidades de padecer CCR se hacen mayores. En nuestra serie, la enfermedad se comportó siguiendo el modelo *Gaussiano* de normalidad, observamos un repunte de la frecuencia de la enfermedad a partir de los 54 años, y un decremento a partir de los 74, con una edad media de presentación de 64 años. Se presentó un caso particular de un individuo de 27 años de edad, normalmente la relación entre cáncer colorrectal y personas jóvenes suele ser de tipo hereditario <sup>130</sup>. Después de la revisión de los antecedentes familiares y del estudio de la pérdida de expresión del sistema de reparación de emparejamientos de ADN (MMR), ambos obtuvieron resultado negativo, por lo que descartamos cualquier relación de la enfermedad con HNPCC.

En cuanto al sexo de la cohorte, obtuvimos valores similares, siendo algo más frecuente en hombres (4,4%). Algunas revisiones <sup>1, 11</sup>, obtienen resultados parecidos, siendo el sexo masculino otro factor de riesgo. Ciertas publicaciones <sup>12, 45</sup> relacionan el sexo con el subsitio anatómico de la neoplasia, asociando una proporción mayor de mujeres con CCR proximal y hombres con CCR distal.

En algunos trabajos se ha discutido la clasificación entre carcinomas de colon derecho (ciego, colon ascendente y colon transversal) e izquierdo (colon descendente, sigma y recto), comunicando diferencias en la epidemiología, clínica y subtipo histológico <sup>131</sup>. Proponiendo que esas discrepancias deben ser causadas por diferencias en la expresión genética, que le confieran un comportamiento distinto en la carcinogénesis <sup>46, 47</sup>, advirtiendo una alta frecuencia de metilación del promotor del gen hMLH-1 en personas con CCR derecho <sup>130, 132, 133</sup>.

La localización de los tumores en nuestra cohorte se distribuyó de manera no uniforme, siendo más frecuente en zonas distales del intestino grueso (62,2%). Aunque la distribución de la neoplasia en el colon derecho fue más frecuente en mujeres (55,4%)

y la de colon izquierdo en hombres (64,7%), no encontramos diferencias significativas respecto a la región anatómica y el sexo del paciente ( $p=0,065$ ), aunque este valor estuvo cerca de la medida tomada como significancia estadística.

El CCR suele ser asintomático en las fases iniciales de la enfermedad, los síntomas y signos son variables e inespecíficos. Normalmente éstos suelen estar relacionados con el subsitio anatómico donde se presentan, así el cáncer de colon derecho está asociado a hemorragias crónicas e inadvertidas, dolor abdominal y presencia de masa en el hemiabdomen derecho. La debilidad, pérdida de peso y anemia suelen ser frecuentes. En cambio el colon izquierdo se caracteriza por la existencia de fenómenos obstructivos que modifican el ritmo intestinal, causando dolor abdominal y rectorragias <sup>59</sup>. Los motivos de consulta de urgencia que presentaron los individuos de nuestro estudio, se dividieron según el síntoma principal, en dolor abdominal (59%), rectorragias acusadas (39%) y melenas (9%), aunque éstos pudieron presentarse al mismo tiempo. La obstrucción intestinal como manifestación clínica fue otro ítem que se comentará en el siguiente punto. Cabe destacar que signos tales como la pérdida de peso inexplicable, la debilidad o cansancio y el cambio en los hábitos de evacuación, no se expusieron habitualmente al personal médico hasta que el paciente no fue preguntado directamente por los mismos, por lo que deben ser puntos de información necesaria para la población general, en las consultas de atención primaria.

El antígeno carcinoembrionario se considera una de las principales herramientas en la evaluación pre, postoperatoria de individuos afectados de CCR, reflejando directamente el pronóstico y la sensibilidad al tratamiento del paciente <sup>28</sup>. Cuando los individuos son diagnosticados a través de los servicios de urgencia, es difícil la valoración del mismo, por lo que se pierde información fundamental para el seguimiento de la enfermedad.

En la mayoría de los pacientes con CEA preoperatorio examinado, los valores mostrados estuvieron por encima de los 5 µg/l. Destacar los niveles de uno de los afectados, con obstrucción asociada a la neoplasia, con un valor desorbitado de 1124 µg/l. Ante este suceso nos planteamos si existió relación entre los niveles del CEA,

estenosis y localización anatómica del tumor, no observando correspondencia en el análisis estadístico ( $p=0,494$ ).

La estadificación del cáncer colorrectal es necesaria para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados del tratamiento. Constituye una parte esencial y punto de referencia de los denominados factores pronósticos. La evaluación clínica y los estudios de localización y extensión servirán para establecer criterios quirúrgicos y la indicación del tratamiento pre, postoperatorio en el paciente. La utilización de distintos métodos de clasificación, *Dukes*, *Astler-Coller*, *Turnbull* han recogido información acerca de la estadificación patológica de la enfermedad, pero sin duda el método más preciso y actualmente más utilizado es el TNM <sup>64</sup>.

En el momento del debut de la enfermedad, los enfermos de nuestro estudio presentaron: Estadio I (11,1%), Estadio II (44,4%), Estadio III (32,2%) y Estadio IV (12,2%). Este factor fue determinante respecto a la supervivencia de los individuos, disminuyendo conforme avanzó el estadio de la enfermedad ( $p=0,033$ ). Nuestros valores son muy próximos a los ya publicados <sup>1</sup>, y a los recogidos por la AECC, obteniendo una tasa de supervivencia observada del 50% a los 5 años.

Existen otros factores derivados del examen patológico de la pieza quirúrgica, con validez pronóstica, como son el grado histológico de diferenciación y el componente mucinoso mayor al 50%. En nuestro estudio encontramos un 80% de tumores con un alto grado de diferenciación y el resto, 20%, fueron indiferenciados. No se observó carcinomas del tipo mucinoso o en anillo de sello, aunque en la literatura <sup>134, 135</sup> está recogido que entre un 10 y un 15% de los tumores colorrectales presentan lagos de mucina extracelular. Estos subtipos de tumores están relacionados con un grado pobre de diferenciación, con una alta inestabilidad de microsatélites y con una preferencia de localización del colon derecho. Nosotros observamos una asociación estadística entre los tumores con pobre diferenciación y la localización en el colon derecho ( $p=0,022$ ), aunque no distinguimos presencia excesiva de mucina.



Otro de los factores asociados a pobre pronóstico es el tamaño tumoral <sup>134, 136</sup>. En nuestro trabajo encontramos un tamaño medio de neoplasia de 4,9 cm que varió entre un mínimo de 1,5 y un máximo de 8,5 cm, donde el 47% de los casos tuvieron un diámetro de la lesión superior a los 5 cm. Este factor fue determinante respecto a la supervivencia de los pacientes, y será discutido en el último punto.

La presencia de células inflamatorias en los tumores malignos humanos es un fenómeno común, la reacción inflamatoria dentro del tumor y en los márgenes invasivos se piensa que es una manifestación de la respuesta inmune frente a las células cancerosas <sup>137</sup>. La influencia de éstas en el comportamiento del CCR se ha asociado con un valor predictivo como se recoge en la clasificación de Jass <sup>135, 138</sup>. En nuestra serie apreciamos un signo evidente de infiltrado linfocitario en el 48% de los tumores, con abundante celularidad inflamatoria, muy definida en el frente de invasión tumoral. Aunque estos indicios fueron indiscutibles, en el análisis no se relacionó con ninguna de las variables estudiadas presentando una gran heterogeneidad, y no confirió valor pronóstico en los pacientes. En el seguimiento de la enfermedad y para la valoración de una posible recidiva de la misma, se hizo la determinación del antígeno carcinoembrionario postoperatorio. El 46% de los individuos presentaron un nivel superior al catalogado como el de población normal (5 µg/l), con un nivel medio de 57,4 y unos valores que oscilaron entre 0,7 y 1361 µg/l. Esto fue indicativo en la mayoría de los casos, junto con la exploración del paciente y las respectivas pruebas de imagen, de la aparición de recurrencia de la dolencia. El 20% fue de manera local y el 33,3% por un estadio más avanzado del carcinoma, con la presencia de metástasis a distancia. Destacar que el 7,3% restante, sufrió recidiva y no tuvo niveles anormales de CEA, por lo que el nivel circulante de antígeno carcinoembrionario en estos casos, no fue una herramienta precisa en la indicación de recurrencia de la enfermedad.

La localización más común de la diseminación de la enfermedad fue el hígado (40%), pulmón (20%) y la zona peritoneal y retroperitoneal (15%). Datos que se relacionan con lo ya publicado <sup>59</sup> sobre las zonas prevalentes de metástasis en el cáncer colorrectal.

## 5.2.- ESTENOSIS

Entre un 15 y un 20% de CCR primarios se manifiestan con oclusión intestinal <sup>139</sup>. La presentación del síndrome obstructivo intestinal por neoplasia colorrectal es una de las causas más frecuentes de consulta en unidades de urgencia hospitalaria, por encima de los procesos apendiculares evolucionados y las hernias estranguladas respecto a las causas principales de obstrucción. La función del intestino se encuentra comprometida, acumulándose gas y líquidos e invirtiéndose el transporte hidroeléctrico, debido al aumento de la presión intraluminal y la elevación de la presión venosa y linfática <sup>140</sup>. Como desenlace el paciente tiene una importante sustracción de la volemia efectiva, un desequilibrio hidroeléctrico importante, acumulación de gases que junto con el incremento de la motilidad intestinal, intentando vencer la obstrucción, produce un cuadro doloroso que puede desencadenar en necrosis y perforación del intestino <sup>141</sup>.

El cáncer colorrectal obstructivo es una patología que en la mayoría de estudios se ha presentado como un factor predictor de peor pronóstico clínico y vital y está asociado a un estadio más avanzado, con un nivel más elevado de metástasis a distancia <sup>142</sup>.

Cuando comparamos la estenosis con las variables clínico-patológicas recogidas en el estudio, la relación entre estenosis y edad del paciente obtuvo una correspondencia positiva, siendo preferente entre los individuos mayores a 65 años, aproximadamente la edad media de la muestra. En la revisión bibliográfica advertimos cifras dispares respecto a éste punto, en algunos análisis no encuentran asociación entre ambas variables <sup>61</sup>, mientras que en otros encuentran una filiación en edades superiores a los 70 años <sup>143</sup>.

La asociación que algunos autores, anteriormente citados, encuentran entre el sexo y el subsitio anatómico del tumor, aunando mujeres con CCR proximal y hombres con CCR distal, no se vio reflejada respecto a la estenosis, no encontrándose diferencia estadística significativa ( $p=0,539$ ). La obstrucción se distribuyó de manera parecida en ambos sexos.

Los síntomas más comunes de esta afección son el dolor cólico, distensión abdominal, estreñimiento y la pérdida de peso, con una manifestación subaguda que cesa espontáneamente. La prevalencia de síntomas cuando la obstrucción está consolidada son intensos y precoces, con vómitos numerosos <sup>11</sup>. En los pacientes del estudio la estenosis se presentó como cuadro clínico de dolor abdominal ( $p<0,001$ ), con cambios en el ritmo intestinal y vómitos, no siendo frecuente la presencia de rectorragias. Los síntomas variaron en función de la localización de la estenosis, en el que el dolor abdominal es altamente prevalente, de gran intensidad y requiere con frecuencia el uso de opioides potentes.

Aunque el lugar más frecuente de estenosis es el colon distal <sup>144</sup>, debido a la propia fisiología del órgano, hay presencia de ésta en el colon derecho, más por la invasión de la válvula ileocecal que por la propia vegetación neoplásica. En nuestra serie el 42,2% de los casos localizados a partir de ángulo esplénico debutaron como estenosis ( $p<0,001$ ), existiendo un porcentaje residual del 10% que se localizaron en la parte proximal del colon.

Tal y como recomienda la Sociedad Americana de Cirujanos Colorrectales <sup>145</sup>, la determinación de CEA pre, postoperatorio puede ser útil como valor pronóstico durante el seguimiento del paciente. Algunos trabajos muestran concentraciones más altas de niveles de antígeno carcinoembrionario en pacientes con estenosis, que disminuyen posteriormente a la descompresión <sup>146</sup>. Al comparar los valores de CEA preoperatorio frente a los individuos con CCE, encontramos que los niveles medios del marcador tumoral fueron mayores en estos individuos (21,7 vs. 102,12 µg/l), aunque la diferencia entre ambos grupos no llegó a ser estadísticamente significativa. Destacar el caso, anteriormente mencionado, del paciente con la tasa mayor de CEA preoperatorio registrada en la serie 1124 µg/l, que presentó obstrucción intestinal. Cuando hicimos el cotejo con el CEA postoperatorio, en el seguimiento de los pacientes, la distribución fue totalmente desigual respecto a los valores normales circulatorios ( $p<0,001$ ), obteniéndose una diferencia media de CEA mayor en el CCE (43,7 vs. 69,9 µg/l)

( $p < 0,001$ ). Los valores del antígeno carcinoembrionario aparecen como una herramienta predictiva en la obstrucción intestinal <sup>147</sup>.

Nuestros resultados confirman las deducciones de artículos anteriormente publicados <sup>60, 61, 148</sup>, donde el tiempo de recidiva (29,9 vs. 45 meses), así como el tiempo medio de supervivencia (37,1 vs. 46,8 meses), fueron significativamente menores ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,009$ ) en individuos con CCE, prediciendo un peor pronóstico a largo plazo de los pacientes. Estos datos sugieren que la presentación de CCR con obstrucción es un factor pronóstico independiente, posiblemente porque la permeabilidad de la pared del intestino aumente con la obstrucción, facilitando la invasión linfática con células tumorales <sup>149</sup> y acrecentando el potencial de producir metástasis a través de los vasos linfáticos o por su diseminación por el peritoneo <sup>150</sup>. Concluyendo que el CCE es más agresivo que otros CCR <sup>144</sup>. En nuestro ensayo la obstrucción intestinal obtuvo tamaños tumorales mayores ( $p < 0,001$ ), infiltración de capas más profundas del tubo digestivo ( $p = 0,002$ ), invasión de nodos linfáticos ( $p = 0,001$ ) y por tanto un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p = 0,009$ ), al momento del diagnóstico.

### **5.3.- ESTUDIO IHQ DE MARCADORES**

Como objetivo del presente trabajo experimental hemos estudiado la utilización de la immunoexpresión de marcadores tisulares implicados en las vías promotoras del CCR, intentando advertir el debut de la neoplasia, su comportamiento biológico, así como predecir el pronóstico vital del paciente. Nuestro modelo experimental sugiere que VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 e índice de proliferación celular (Ki-67) tienen un impacto potencial en la carcinogénesis y en la historia natural de la enfermedad.

#### **5.3.1.- Análisis de expresión IHQ**

La evaluación actual de los resultados de técnicas inmunohistoquímicas por parte del investigador-patólogo, conlleva una serie de limitaciones respecto al tiempo invertido, a

la subjetividad de la interpretación y la reproducibilidad de los resultados, dado el alto número de factores que pueden influir en el resultado final de la técnica <sup>151</sup>. La metodología actual de interpretación, procedimiento *de visu*, sigue siendo una técnica válida y aceptada por todos los círculos médicos e investigadores, para el recuento del número de células teñidas así como para ponderar la gradación de intensidad de la señal acorde con escalas arbitrarias <sup>152</sup>. Pero todavía existe la posibilidad de que el proceso de interpretación, por parte del observador, pueda diferir con otros investigadores u otros laboratorios <sup>153</sup>.

El empleo de software informático para el análisis digital de imágenes, basado en procesos de segmentación de imágenes, se ha destacado como un instrumento capaz de minimizar tales problemas <sup>154</sup>.

En el presente estudio, además de la técnica habitual, hemos utilizado el programa de software informático libre *ImageJ*, desarrollado por *National Institutes of Health*, con distintas herramientas específicas, para el análisis de preparaciones histológicas, la determinación cuantitativa de la expresión de proteínas nucleares y de aquellas que se expresaron en citoplasma y/o membrana <sup>155</sup>.

La utilización de distintas aplicaciones (*Color Deconvolution*) nos proporcionó la posibilidad de sustraer por separado las gamas de colores de la micrografías, así como de retirar el correspondiente fondo para la identificación de la señal específica derivada del cromógeno DAB <sup>156</sup>. A partir de los datos obtenidos en esta imagen, se alcanzó el *score* final de la tinción.

La parte más difícil en la interpretación de los resultados, fue la de otorgar el valor de referencia de inmunorreactividad nuclear porcentual, que nos sirvió para diferenciar entre tumores considerados con expresión positiva y negativa (casos de p73 y Ki-67). Los datos consultados en distintos ensayos fueron dispares <sup>157-163</sup>, cada grupo seleccionó un porcentaje diferente que consideraron como manifestación positiva. En nuestro trabajo optamos por utilizar la mediana (distribución no normal) como

divergencia en la dispersión, coincidiendo con una de las últimas publicaciones descritas <sup>157</sup>.

Cuando se compararon los dos sistemas de evaluación del estudio, no se encontraron valores discrepantes entre ambos métodos, obteniendo una correspondencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) para todos los casos (VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 y Ki-67).

Con los resultados obtenidos y los de otros grupos <sup>164</sup>, este método se presenta como una herramienta adicional o como una gran alternativa, en la valoración y cuantificación de las reacciones inmunohistoquímicas.

### **5.3.2.- MSI**

El fenómeno de inestabilidad de microsatélites (MSI) no está confinado al CCR hereditario, y se puede distinguir entre el 10 y el 15% de carcinomas colorrectales esporádicos en los que no se aprecian antecedentes familiares de la enfermedad <sup>77</sup>. En estos casos la mutación de genes de MMR es infrecuente y la causa de la no expresión de estas proteínas es debido a la hipermetilación de sus respectivos promotores <sup>165</sup>.

Teniendo en cuenta que la sensibilidad del análisis de MSI por IHQ es de aproximadamente del 98%, comparándolo con análisis moleculares tipo PCR <sup>77</sup>, consideramos que la detección de MSI por técnicas inmunohistoquímicas es una buena forma comparable en alto grado a las técnicas de biología molecular.

Tras el análisis exhaustivo de las muestras tumorales, el estudio de la inestabilidad de microsatélites a través de IHQ, resultó negativo para todos los casos, observándose una marcada expresión de MLH-1 y MSH-2 en el epitelio colónico de las muestras tumorales. En nuestra serie la presencia de inmunorreactividad del sistema MMR, fue evidente en todas las zonas tumorales así como en el epitelio sano, la totalidad de los focos tumorales presentaron una clara manifestación positiva para ambas proteínas.

Según los resultados encontrados en la bibliografía consultada, en nuestro trabajo esperaríamos encontrar una relación de entre 9 y 13 pacientes con estas características

(no expresión de MLH-1 y MSH-2). Una de las posibles explicaciones por la que no hemos hallado esta correspondencia es la relación entre tumores esporádicos MSI-H y el alto riesgo de neoplasias sincrónicas <sup>166</sup>. Debido a la introducción de esta característica en los criterios de exclusión del ensayo, puede ser una de las explicaciones por las que no se presentaron tumores con ausencia de las proteínas estudiadas.

El CCR esporádico con MSI-H es localizado preferentemente en el colon derecho, con un grado de diferenciación histológico pobre y una alta concentración de mucina, así como un grado de infiltración linfocitaria peritumoral alto <sup>50, 75</sup>. En nuestra serie observamos una relación entre la localización de la neoplasia en el colon derecho y un menor grado de diferenciación ( $p=0,022$ ), y una tendencia entre ésta disposición y un mayor infiltrado linfocitario, aunque no tuvo relevancia estadística ( $p=0,083$ ).

La asociación entre éste subtipo de tumores colorrectales y aquellos del tipo mucinoso es clara <sup>51</sup>, la no aparición de éstos en el estudio así como de tumores MSI-H, parecen ir de la mano.

Aunque los tumores de colon derecho presentaron las mismas características que los tumores MSI-H, no hubo asociación entre ellos, por lo que sería recomendable ampliar el estudio para comprobar estos resultados.

Por último, podemos deducir por los resultados obtenidos en el análisis de expresión de MLH-1 y MSH-2, y de la revisión de los antecedentes de los pacientes, que todos los tumores de la serie, siguieron la vía clásica supresora.

### **5.3.3.- VEGF**

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), es una citoquina con un alto potencial específico en la inducción de la proliferación de células endoteliales, teniendo un papel muy importante en la angiogénesis y linfangiogénesis de distintos tumores sólidos <sup>167</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que el crecimiento tumoral y la metástasis dependen de la angiogénesis <sup>168</sup>. El aumento de la vascularización por la embolización tumoral, no sólo afecta al desarrollo del tumor sino también favorece la diseminación hematógica por un aumento de la densidad de microvasos <sup>169</sup>.

Algunos autores han evaluado la expresión de VEGF circulante y la han relacionado de manera dispar con la enfermedad <sup>170, 171</sup>. Su determinación es dificultosa técnicamente y los valores pueden depender del método de recogida y del procesado posterior de la muestra <sup>172</sup>. Los resultados se pueden achacar no solo al propio tumor, sino también a la producción de VEGF en otros componentes como plaquetas, granulocitos y monocitos, por lo que su concentración plasmática puede verse alterada <sup>173, 174</sup>.

En el análisis de los niveles de expresión de VEGF en la neoplasia primaria, encontramos una alta reactividad de VEGF en la zona invasiva del tumor, hallando una correlación estadística con la estenosis como debut del CCR ( $p=0,01$ ), un tamaño tumoral superior ( $p=0,025$ ), un aumento de la invasión linfática adyacente ( $p<0,001$ ), un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p<0,001$ ) y un nivel superior de CEA postoperatorio, aún con el tumor primario resecado ( $p=0,013$ ). La asociación entre la expresión de VEGF y la estenosis en CCR hace pensar que debe ser un factor implicado en el crecimiento del tumor y sus vías de expansión. Estas evidencias sugieren que VEGF tiene un papel importante, vía paracrina, en la promoción y la angiogénesis del CCR.

Creemos que un incremento de la angiogénesis producida por VEGF, en condiciones pre-malignas, actuaría favoreciendo la transición de hiperplasia a neoplasia potenciando el crecimiento de los clones de células con lesiones pre-malignas <sup>175</sup>.

Además actuaría como llave promotora de la angiogénesis tumoral, promoviendo el crecimiento y la invasión de tejidos adyacentes y a distancia, mostrándose reflejado en el estadio clínico del paciente y en su pronóstico vital <sup>176</sup>.

Cuando analizamos los tiempos medios de recurrencia (25,7 vs. 43,2 meses) y de supervivencia (31,2 vs. 47,3 meses), respecto a la expresión de VEGF en la neoplasia,



observamos una gran desigualdad entre grupos que llegó a tener significancia estadística ( $p=0,001$ ;  $p<0,001$ ).

Todos estos datos nos sugieren que la identificación de VEGF en los tumores colorrectales, se presenta como un marcador clínico que indica un fenotipo maligno, por lo que deben ser una diana potencial en el tratamiento de esta enfermedad.

#### **5.3.4.- COX-2**

La Ciclooxygenasa-2 es una enzima inducible que es indetectable en la mucosa normal colónica pero que está sobreexpresada en el 80% de las células del CCR <sup>177</sup>. Parece estar involucrada en la proliferación neoplásica en las criptas aberrantes del colon, mediante la inhibición de la apoptosis de células tumorales y por el favorecimiento de la expansión tumoral induciendo angiogénesis <sup>178</sup>. Podríamos diferenciar dos vías principales de acción en las que está involucrada esta proteína, una vía promotora del desarrollo <sup>179</sup> y otra vía de propagación del tumor <sup>180</sup>.

En este trabajo hemos demostrado, que la expresión de COX-2 en el tumor, estuvo relacionado con un fenotipo maligno de la enfermedad, con un tamaño tumoral superior ( $p=0,012$ ), la obstrucción como debut de la enfermedad ( $p=0,01$ ), la invasión de capas más interiores del tubo digestivo ( $p=0,014$ ), invasión linfática ( $p=0,012$ ) y por lo tanto un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p=0,001$ ).

Existe una asociación clara entre la expresión de COX-2 y la obstrucción intestinal en el CCR, esta asociación podría deberse a la implicación de esta enzima en procesos inflamatorios a través de la producción de prostaglandinas. Aunque el papel exacto de COX-2 en el crecimiento tumoral no se conoce, postulamos que debe tener alguna actividad en el estroma que influya en el crecimiento. Las células inflamatorias regulan las funciones de células endoteliales relacionadas con el tumor y la angiogénesis inflamatoria. En el curso de la respuesta fisiológica, el tejido intenta reclutar células de componente inflamatorio que proporcionen la producción de citoquinas y factores de crecimiento que promuevan la angiogénesis <sup>175</sup>. De esta manera, una mayor expresión

de COX-2 se relaciona con una mayor masa tumoral y con una fase más avanzada de la enfermedad.

Los datos recogidos proponen que los tumores con mayor expresión de COX-2 tienen un comportamiento más agresivo respecto a los de menor expresión, lo que confirma que COX-2 se expresa en distintas fases del CCR <sup>181</sup> participando activamente en la vía promotora y en la propagación de la enfermedad.

En el seguimiento de los pacientes, los niveles circulantes de CEA postoperatorio recogidos fueron superiores (44,5 vs. 67,3 µg/l) en individuos cuyo tumor primario expresó COX-2 ( $p=0,048$ ). Esta asociación nos hace pensar que la mayor inmunorreactividad de COX-2 en los tumores primarios podría anticipar un peor pronóstico del paciente. Cuando revisamos los tiempos medios de recurrencia de la enfermedad (32 vs. 40,9 meses) y de la supervivencia de los pacientes (37,6 vs. 44,9 meses), respecto a la expresión de COX-2, éstos fueron sensiblemente menores, aunque los valores no fueron lo suficientemente alejados para alcanzar la significancia estadística acordada ( $p=0,149$ ;  $p=0,119$ ). Esto nos indica que COX-2 no tiene un peso individual frente al pronóstico vital del paciente, por lo que debe asociarse con otros marcadores para ver su potencial real.

#### **5.3.5.- IGF-1R**

El sistema del factor de crecimiento parecido a la insulina, IGF-1, IGF-2, así como sus respectivos receptores, juega un papel prominente en el desarrollo del cáncer, regulando la progresión del ciclo celular, la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis en las células cancerígenas <sup>182, 183</sup>. El receptor de IGF-1 y su vía de señalización han sido asociados a enfermedades inflamatorias intestinales <sup>94</sup> y a la carcinogénesis colorrectal <sup>184</sup>, donde las células tumorales presentan una dependencia de factores de crecimiento para su progresión. El número de receptores celulares de IGF-1 en el epitelio digestivo, es fundamental en la ejecución de un fenotipo maligno <sup>93</sup>.

En el presente trabajo la elevada expresión de este receptor se consideró asociada a este modelo de progresión, presentándose con mayor frecuencia en los tumores que debutaron como estenosis ( $p=0,008$ ), con un diámetro de neoplasia mayor ( $p=0,03$ ), una pobre diferenciación del tejido tumoral ( $p=0,002$ ) y un estadio más avanzado de la enfermedad ( $p<0,001$ ), que podría ser debido a la facilitación que este factor ejerce sobre la promoción y la metástasis por vía linfática <sup>185</sup>.

Conjuntamente IGF-1 puede contribuir a un mayor potencial invasivo y metastásico del CCR debido a sus efectos sobre la motilidad celular, migración y aumento de expresión de VEGF <sup>186</sup>. En un estudio reciente <sup>187</sup>, demuestran que la inhibición de IGF-1R puede impedir por medios indirectos la expresión de VEGF, por lo que reafirma la relación entre ambas proteínas estudiadas.

Como ocurrió en el caso de COX-2, cuando se estudiaron los valores de CEA postoperatorio, fue más frecuente encontrar valores mayores en individuos con IGF-1R (+) ( $p=0,025$ ) y tasas por encima del nivel normal ( $p=0,016$ ). Por lo que la expresión de IGF-1R en la neoplasia podría predecir un peor pronóstico en la enfermedad.

En cambio, cuando realizamos el estudio de recurrencia (31 vs. 41 meses) y supervivencia (36,4 vs. 45,3 meses) de los pacientes respecto a la expresión de IGF-1R, no encontramos un nivel de significancia estadístico que pudiera actuar en el pronóstico vital del paciente. Aunque no se alcanzó la cota de significancia marcada respecto a la cuantificación de IGF-1R, los valores medios de recurrencia y de supervivencia de los individuos con menor expresión del receptor fueron ostensiblemente mayores, por lo que la presencia aberrante de este receptor en el tumor debe tener relevancia clínica y ser una diana potencial en las estrategias terapéuticas.

#### **5.3.6.- p73**

La estructura de la proteína p73 es muy homogénea a la de p53, teniendo muchas funciones comunes, la familia de estas proteínas está involucrada en la regulación de otros genes a nivel de regiones promotoras, por lo que debe estar implicada en la

supresión tumoral <sup>188</sup>. Se ha visto que la pérdida de heterocigosidad (LOH) o la activación del alelo silente de p73 <sup>189</sup>, es un evento común en el desarrollo de cánceres humanos, reflejando una proliferación incontrolada y una pérdida de diferenciación celular <sup>85, 190</sup>.

El endotelio colorrectal benigno generalmente muestra una tinción débil de p73 o no se evidencia, conforme se avanza en la transformación el nivel de p73 aumenta en el tejido. En nuestro caso la expresión media de p73 en la neoplasia fue del 37%, con una variación de niveles de entre 0-100%. La gran variabilidad de los resultados obtenidos pudo deberse a la heterogeneidad regional del tumor.

Varios estudios han verificado la relación existente entre la expresión de p73 y las variables patológicas de la enfermedad <sup>191</sup>, sugiriendo que puede ser un buen marcador de progresión y agresividad tumoral. Nuestro trabajo pone de manifiesto una relación directa con el debut de la neoplasia como obstrucción intestinal ( $p=0,002$ ), una mayor invasividad del tumor primario de capas más profundas del intestino ( $p=0,023$ ) y de los nodos linfáticos adyacentes ( $p=0,042$ ). Respecto a la relación de la expresión de p73 con el estadio de la enfermedad, el valor del estadístico fue mayor al indicado ( $p=0,055$ ), aunque este dato nos sugiere una tendencia que hace pensar que puede estar de alguna manera conectado.

La inmunorreactividad de p73 en el tejido tampoco fue indicativa de mayores niveles de CEA. Por otra parte, en nuestro trabajo apreciamos como los tumores de individuos con mayor porcentaje de expresión de p73 son más proclives a la recidiva y en menos tiempo (31,1 vs. 45,7 meses) ( $p=0,005$ ), así como indicativo de la supervivencia de los pacientes (35,7 vs. 50,4 meses) ( $p=0,001$ ).

Estos datos, además de los estudios ya realizados en el CCR <sup>163, 192</sup> y en hepatocarcinoma <sup>193</sup>, nos indican que la expresión de p73 en la neoplasia primaria puede ser un elemento que anticipe un peor pronóstico vital del paciente. La sobreexpresión de p73, debe contribuir al desarrollo y diseminación del tumor y puede poseer un valor como marcador molecular.

### 5.3.7.- Ki-67

Ki-67 es una proteína que se expresa sólo en células proliferativas y es utilizada para distinguirlas <sup>114</sup>. La proliferación descontrolada es una característica de malignidad en diferentes tumores y la medición del antígeno Ki-67 por IHQ parece un buen instrumento para valorarla <sup>194</sup>.

En nuestro trabajo hemos observado una amplia distribución del porcentaje de expresión de Ki-67 en el CCR, con unos valores que oscilaron entre 11-92%. Estos se dispersaron de forma no normal, cuya mediana fue del 66%.

Varios trabajos apoyan el papel de este marcador en las consecuencias clínicas del CCR, nuestros resultados fueron comparables con los estudios de otros investigadores <sup>195-197</sup>, en los cuales se encuentra relación entre una mayor expresión de esta proteína con las características de fenotipo maligno en la neoplasia, como son la estenosis ( $p=0,012$ ) <sup>157</sup>, un tamaño tumoral mayor ( $p=0,005$ ) e invasión de la capa serosa ( $p=0,008$ ). Por otra parte, encontramos correspondencia entre un estadio más avanzado de la enfermedad (estadio TNM III-IV) y una mayor índice de proliferación ( $p<0,001$ ), con una afectación de nodos linfáticos adyacentes y presencia de metástasis a distancia, lo que nos hace pensar que debe estar implicado en alguna de las vías de diseminación de la enfermedad.

Después del análisis univariante, encontramos una asociación entre el índice de proliferación de las células en la neoplasia primaria y el tiempo de recidiva ( $p=0,015$ ) y supervivencia ( $p=0,003$ ) del enfermo. Estos datos concuerdan con el de otros grupos <sup>198</sup> que encuentran una alta probabilidad de recurrencia y menor supervivencia en tumores de estas características.

Podemos concluir que la tasa de proliferación celular, medida a través de la expresión de Ki-67, es una buena herramienta del pronóstico clínico en el CCR.

### **5.3.8.- Correlación de la expresión**

Múltiples evidencias muestran que la carcinogénesis es un proceso combinado, en el que las células y el ambiente tumoral deben estar alterados <sup>120, 199, 200</sup>. Nuestros resultados sugieren que la transformación de células normales a células malignas, su progresión y diseminación, requiere de varios eventos que le confieran un fenotipo característico. La expresión simultánea de las proteínas examinadas debe ser tónica inherente en el CCR.

El análisis de coexpresión nos proporcionó una asociación estadística positiva entre todos los marcadores estudiados a excepción de IGF-1R-p73 y Ki-67-p73, aunque sus valores fueron muy próximos al nivel de significancia marcado. Estas deducciones apoyan la teoría que las células en su proceso de transición, adquieren nuevas propiedades como la expresión aberrante de enzimas, factores de crecimiento y sus receptores, que actúan de manera autocrina y paracrina en la supervivencia de la línea, relacionándose con diferentes grados de vascularización del tumor y su capacidad invasiva. La coexpresión de estos factores significaría que deben estar involucrados en vías que favorezcan las características anteriormente mencionadas.

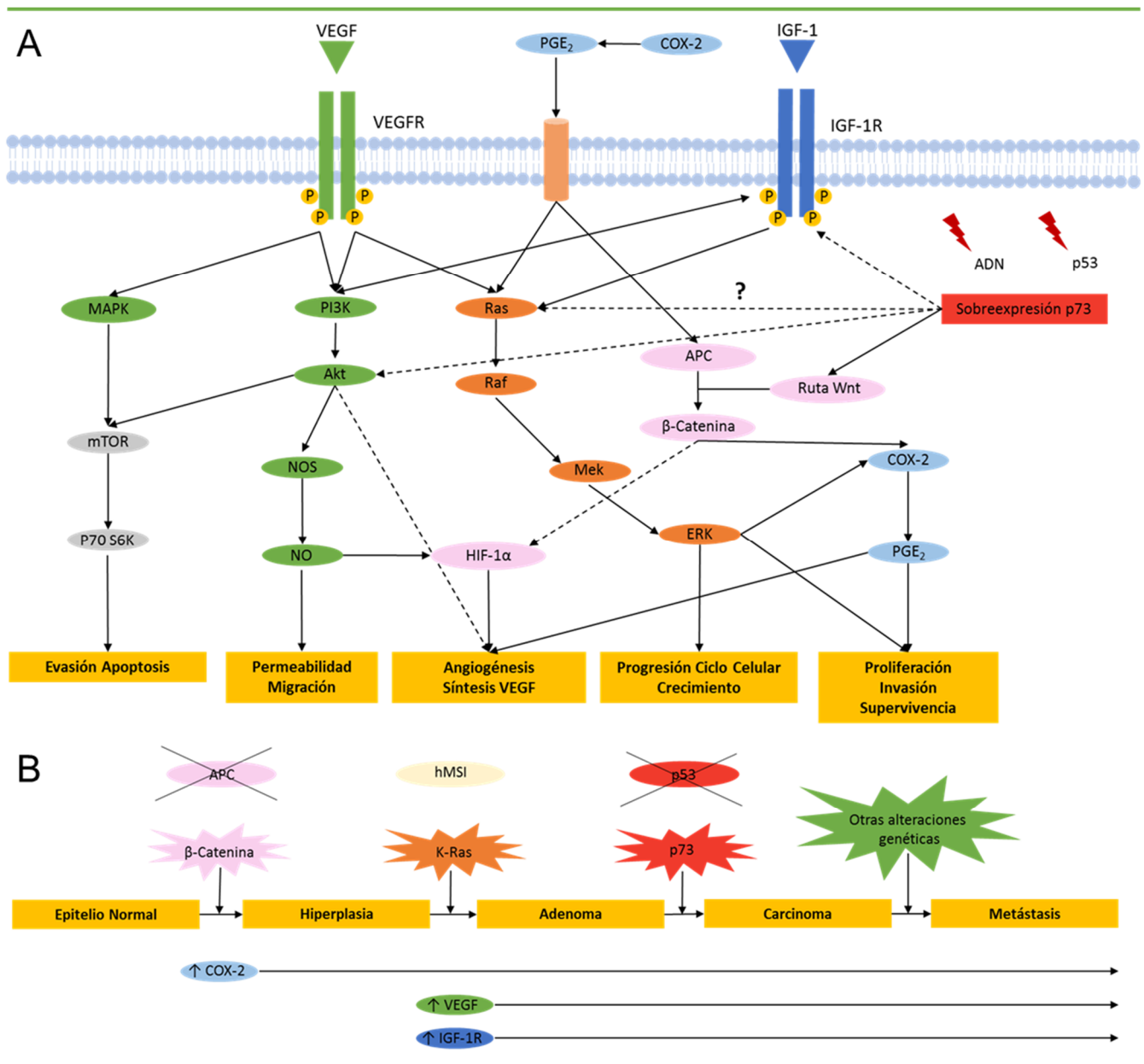
Consultando la bibliografía existente, advertimos como diferentes autores obtienen resultados que correlacionan la expresión entre los factores analizados (Tabla 5.3.8).

**Tabla 5.3.8.- Coexpresión de proteínas en CCR en la bibliografía**

Referencias	Proteínas estudiadas	Resumen de resultados
Famulski et al., 2006 <sup>201</sup> ; Guan et al., 2003 <sup>88</sup> .	VEGF-p73	p73 actúa como un oncogén involucrado en la regulación de factores angiogénicos y participando en la modulación de la formación de microvasos.
Soumaoro et al., 2006 <sup>202</sup> ; Gupta et al., 2007 <sup>58</sup> .	VEGF-COX-2	Sugieren la posible existencia de un mecanismo de corregulación de los dos genes en las células tumorales, mediado por el receptor de prostaglandinas. Promoviendo la neovascularización.
Reinmuth et al., 2002 <sup>187</sup> ; Peters et al., 2003 <sup>203</sup> ; Liet al., 2013 <sup>185</sup> .	VEGF-IGF-1R	La vía de señalización asociada a IGF-1R induce angiogénesis y linfangiogénesis mediada por VEGF, contribuyendo a la promoción y diseminación del CCR.
Basilio and Pannain, 2015 <sup>204</sup> ; Stroescu et al., 2008 <sup>205</sup> .	VEGF-Ki-67	La mayor presencia de VEGF en el microambiente tumoral debe favorecer la proliferación y con ello una mayor presencia de Ki-67.
Bustin et Jenkins, 2001 <sup>98</sup> ; Bustin et al., 2002 <sup>206</sup> ; Si et al., 2000 <sup>207</sup> .	COX-2-IGF-1R	La expresión de COX-2 y la síntesis de PGE2 están reguladas por el receptor de IGF de manera autocrina en el CCR. Incrementando el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, facilitando la progresión y la invasividad.
Zhang et al., 2011 <sup>208</sup> ; Lau et al., 2009 <sup>209</sup> .	COX-2-p73	COX-2 modula diferencialmente la isoforma p73 y con ello la entrada en apoptosis celular.
Sakuma et al., 1999 <sup>210</sup> ; Ferrandina et al., 2003 <sup>211</sup> ; Mao et al., 2006 <sup>212</sup> ; Shin et al., 2014 <sup>213</sup> .	COX-2-Ki-67	COX-2 regula la proliferación celular, aumentando la detección de Ki-67 en células tumorales. La inhibición de la ciclooxigenasa reduce sensiblemente la actividad proliferativa.
Peters et al., 2003 <sup>203</sup> .	IGF-1R-Ki-67	IGF-1R estimula la expresión de Ciclina D2, acelerando la progresión del ciclo celular de fase G1 a S, indicando un aumento de la actividad proliferativa de las células del CCR.
Nahor et al., 2005 <sup>214</sup> ; Werner, 2002 <sup>215</sup> .	IGF-1R-p73	La interrupción de la vía mediada por p73 produce problemas en la supresión del gen de IGF-1R, con una activación de éste por vía endocrina y autocrina, ayudando a la progresión por los métodos anteriormente citados.
Arvai et al., 2015 <sup>216</sup> .	p73-Ki-67	El aumento del índice de proliferación es otro paso en la transformación de la mucosa sana en CCR, la conservación de la transformación está asociada a la expresión anormal de la familia de proteínas antiapoptóticas p53.

Reparando en los resultados aquí presentados más los revisados en la bibliografía, proponemos un sistema en el cual se relacionan las diferentes vías de coexpresión y sus consecuencias en la fisiología tumoral (Figura 5.3.8).

**Figura 5.3.8.- Rutas de acción de los marcadores en el CCR.**



A. Rutas principales asociadas a los marcadores estudiados y sus principales consecuencias fisiológicas. B. Secuencia Adenoma-Carcinoma con los principales eventos asociados a cada fase.



## **5.4.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

Durante décadas han sido muchos los esfuerzos en la identificación de factores pronósticos en el CCR. La predicción de la evolución clínica se ha relacionado durante años con las características del enfermo y con los rasgos macroscópicos evidentes en el tumor. En este momento, el posible valor pronóstico de la clasificación molecular, es uno de los aspectos más interesante de este tipo de estudios, en el cual la expresión de distintos factores asociados a la neoplasia confiere una peculiaridad en el progreso de la enfermedad y por tanto en el pronóstico vital del individuo.

Una vez examinado todos los factores de forma individual, procedemos a discutir su valor conjunto en la determinación de la estenosis y el juicio vital de los pacientes. Para ello elegimos todas las variables que fueron significativas en el análisis estadístico univariante.

### **5.4.1.- Estenosis**

En un esfuerzo por definir subpoblaciones de pacientes con un resultado menos favorable, hemos examinado la utilidad de la combinación de varios marcadores que predijeran la aparición del CCE, empleando la expresión en el tumor de las diferentes proteínas estudiadas. Para valorar la medida en que éstas determinan la estenosis como debut de la enfermedad procedimos al análisis multivariante del mismo. Para ello utilizamos el modelo de regresión logística binaria, cuya principal diferencia con el modelo de riesgos proporcionales de COX, es que la variable independiente del estudio no está subordinada al tiempo. Introdujimos los factores siguiendo el modelo retroceder por paso, en el cual se insertan todas las variables dependientes y se extraen una a una hasta producir el resultado más representativo.

Si bien, la sobreexpresión VEGF y Ki-67 generó valores significativos en el análisis univariante, no actuaron del mismo modo en esta prueba. Aunque presentan índices de riesgo superiores, no llegan a tener diferencia estadística.

La elevada manifestación de COX-2, p73 e IGF-1R actuó de manera independiente en el análisis, con una probabilidad tres veces superior de presentar estenosis asociada al CCR. La implicación de estas proteínas en la inflamación, en vías de promoción y crecimiento, debe suscitar la extensión del diámetro del tumor, desencadenando la oclusión endoluminal.

Los resultados obtenidos demuestran que deberíamos tener la capacidad de identificar, en programas de cribado poblacional, la sobreexpresión de COX-2, p73 e IGF-1R en lesiones en estadio precoz. La presencia de estas proteínas nos revelaría el posible desarrollo de CCR con una alta probabilidad de obstrucción, y deberían ser dianas potenciales en el tratamiento.

#### **5.4.2.- Recidiva y supervivencia**

Numerosos factores deben determinar, conjuntamente o por separado, el pronóstico clínico y vital del paciente, proponiendo que algunos marcadores moleculares así como las características patológicas de la propia neoplasia, pueden ser útiles en identificar subgrupos de pacientes que podrían beneficiarse de tratamiento adyuvante específico. La presentación de urgencia en el CCR es un elemento vinculado a una supervivencia adversa y peor pronóstico, con uso en la oncología clínica <sup>217</sup>. La obstrucción intestinal como debut del CCR, se manifestó como un efecto desfavorable actuando de manera independiente, acrecentando la tasa de recurrencia (HR 1,56) y reduciendo significativamente la tasa de supervivencia (HR 1,718). Desde una perspectiva clínica, estos datos nos sugieren que pacientes con CCE en estadio TNM menos avanzado, deberían beneficiarse del tratamiento adyuvante postoperatorio.

Como hemos comentado anteriormente, el CCR obstructivo presenta dimensiones tumorales mayores a las otras neoplasias, el tamaño tumoral parece afectar al pronóstico a través de la penetración en capas más profundas de la pared intestinal, involucrando nodos linfáticos adyacentes y aumentando la probabilidad de diseminación de la enfermedad <sup>218</sup>. Aunque en este modelo no produjo resultados respecto a la

recurrencia (HR 1,06), sí lo hizo respecto a la supervivencia (HR 2,267). La invasión linfática, caracterizada por la extensión de células tumorales a través de vasos linfáticos, parece un elemento articulado directamente con el diámetro de la neoplasia. La infiltración tumoral de nodos linfáticos adyacentes incrementa el riesgo de recurrencia (HR 1,8) y se muestra como el factor de riesgo más importante frente a la supervivencia (HR 4,2). En el acto quirúrgico, la excisión total de todos los nodos próximos a la neoplasia, debe ser un factor que disminuya la probabilidad de recidiva y aumente el tiempo de sobrevida de los pacientes <sup>219</sup>.

La fuerte asociación de expresión entre VEGF y p73, encontrada en este trabajo y su potencial papel en la angiogénesis aumentando la densidad de microvasos en el frente tumoral, parece jugar un rol importante en la recurrencia (HR 2,2) y la supervivencia (HR 2,2), reforzando las observaciones que les otorga capacidad como marcador biológico de la progresión clínica de la enfermedad.

Del mismo modo el marcador de proliferación celular Ki-67, se mostró como un elemento significativo en la evolución clínica del paciente, aumentando las probabilidades de recidiva (HR 1,7) y disminuyendo la supervivencia (HR 2,3). El índice de proliferación debe usarse como herramienta de pronóstico en la enfermedad, después de la resección del CCR.

La utilización de los niveles circulantes de CEA se manifiesta como un factor independiente de la recurrencia (HR 2,1) y la supervivencia (HR 1,9) de los enfermos, y está asociado fuertemente con el estadio de la patología. La concentración de CEA es la prueba más rentable para la detección preclínica y es un indicador de la recidiva en pacientes asintomáticos con una sensibilidad del 80% <sup>220</sup>. La *American Joint Committee on Cancer*, sugiere que los niveles plasmáticos de CEA deben añadirse al sistema TNM de clasificación, tomando como referencia el punto de corte de 5 µg/l (5 ng/ml) <sup>221</sup>. La determinación de CEA debe prescribirse como test recomendado cada 2-3 meses, durante al menos dos años después de la resección tumoral <sup>31</sup>.

Los resultados aquí descritos refuerzan la tesis de que el CCE, el estudio de las características de las muestras de tejido tumoral, la expresión de proteínas vinculadas a la promoción y diseminación, así como la evaluación de CEA circulante en sangre, son biomarcadores potenciales en el cáncer colorrectal, que predicen la aparición de recidiva así como la supervivencia de los pacientes.

## **VI.- CONCLUSIONES**



De los resultados obtenidos en este estudio obtenemos las siguientes conclusiones:

1. La obstrucción intestinal como proceso agudo se presenta como cuadro clínico de dolor abdominal, prominentemente en colon izquierdo y asociado a un estadio más avanzado de la enfermedad.
2. El proceso obstructivo asociado al CCR, es un factor predictor independiente de la recidiva y la supervivencia de los pacientes.
3. La ausencia de expresión de MLH-1 y MSH-2 en el CCR esporádico, se asocia a neoplasias sincrónicas de tipo mucinoso, con un grado de diferenciación histológico pobre y preferencia de localización en colon derecho.
4. VEGF, COX-2, IGF-1R y p73 son factores implicados en el crecimiento, proliferación y supervivencia del tumor y sus vías de expansión, confiriendo un comportamiento más agresivo a la patología, asociándose a un estadio más avanzado de la enfermedad en el momento del diagnóstico.
5. La presencia masiva de COX-2, p73 e IGF-1R en la neoplasia primaria, opera de forma autónoma aumentando la probabilidad de CCE.
6. VEGF, p73 y Ki-67 son marcadores individuales que predicen la recidiva de la neoplasia y la supervivencia de los pacientes.
7. IGF-1R y COX-2 no poseen peso específico frente al pronóstico vital del paciente.
8. La expresión de VEGF, COX-2, IGF-1R, p73 en células tumorales deben ser dianas moleculares en el tratamiento adyuvante de la enfermedad.

9. La infiltración tumoral de nodos linfáticos adyacentes se muestra como el factor de riesgo más importante frente a la supervivencia.
10. La determinación pre-postoperatoria del antígeno carcinoembrionario sérico, es una buena herramienta en la detección preclínica del CCR y un indicador de recurrencia.
11. El método de cuantificación por análisis de imagen con el software *ImageJ* es una gran alternativa a los métodos tradicionales, con un gran nivel de equivalencia y reproducibilidad de resultados, eliminando el factor subjetivo del diagnóstico.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. - Colorectal cancer. - Lancet 2014 Apr 26;383(9927):1490-502.
2. Cheng L, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. Am J Clin Oncol 2011;34(6):573-580.
3. Ferlay J. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [GLOBOCAN 2012 v1.0]. 2012.
4. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer 2013;132(5):1133-1145.
5. Expósito Hernandez J, Escalera de Andrés C, Torró García-Morato C et al. II Plan Integral de Oncología de Andalucía 2007-2012. 2007. Junta de Andalucía. Consejería de Salud.
6. Bingham SA, Day NE, Luben R et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet 2003;361(9368):1496-1501.
7. Rozen P, Lynch HT, Figer A et al. Familial colon cancer in the Tel-Aviv area and the influence of ethnic origin. Cancer 1987;60(9):2355-2359.
8. Stemmermann GN, Nomura AM, Heilbrun LK. Dietary fat and the risk of colorectal cancer. Cancer Res 1984;44(10):4633-4637.
9. Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliovaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. Br J Cancer 2001;85(3):357-361.
10. Hu J, La VC, Negri E, Mery L. Nutrients and risk of colon cancer. Cancers (Basel) 2010;2(1):51-67.
11. Ragland JJ, Londe AM, Spratt JS, Jr. Correlation of the prognosis of obstructing colorectal carcinoma with clinical and pathologic variables. Am J Surg 1971;121(5):552-556.

12. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 2015;21(17):5167-5175.
13. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20(48):18151-18164.
14. Nowacki TM, Bruckner M, Eveslage M et al. The risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2015;60(2):492-501.
15. Hamilton SR. Colorectal carcinoma in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1985;89(2):398-407.
16. Svrcek M, Cosnes J, Beaugerie L et al. Colorectal neoplasia in Crohn's colitis: a retrospective comparative study with ulcerative colitis. *Histopathology* 2007;50(5):574-583.
17. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348(10):919-932.
18. Lynch HT, Smyrk TC. Hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol* 1999;26(5):478-484.
19. Yiu R, Qiu H, Lee SH, Garcia-Aguilar J. Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in different age groups. *Dis Colon Rectum* 2005;48(11):2061-2069.
20. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116(6):1453-1456.
21. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(23):1758-1762.
22. Jass JR. Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology* 1998;32(6):491-497.

23. Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. *Am J Med* 1999;106(1A):3S-6S.
24. Parrilla P, Landa JI. Manual de Cirugía de la Asociación Española de Cirujanos (AEC). Médica Panamericana, editor. 2ª Edición. 2010. AEC.
25. Romero Simó M et al. Guía de práctica clínica en el cáncer colorrectal de la Sociedad Valenciana de Cirugía. Generalitat Valenciana.Conselleria de Sanitat, editor. 2002.
26. Heiken JP. Screening for colon cancer. *Cancer Imaging* 2006;6:S13-S21.
27. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):67-81.
28. Nozoe T, Rikimaru T, Mori E, Okuyama T, Takahashi I. Increase in both CEA and CA19-9 in sera is an independent prognostic indicator in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2006;94(2):132-137.
29. Zamcheck N, Doos WG, Prudente R, Lurie BB, Gottlieb LS. Prognostic factors in colon carcinoma: correlation of serum carcinoembryonic antigen level and tumor histopathology. *Hum Pathol* 1975;6(1):31-45.
30. Rosen L. Practice parameters for the detection of colorectal neoplasms. The American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum* 1992;35(4):389-390.
31. American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996;14(10):2843-2877.
32. Nelson H, Petrelli N, Carlin A et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(8):583-596.
33. Hartmann H. New procedure for the removal of cancers of the terminal part of the pelvic colon. *Secretariat of the Association* 1921;411-413.
34. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986;1(8496):1479-1482.

35. Pera M, Pascual M. [Quality standards in rectal cancer surgery]. *Gastroenterol Hepatol* 2005;28(7):417-425.
36. Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg* 2002;235(4):449-457.
37. Hazebroek EJ. COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. *Surg Endosc* 2002;16(6):949-953.
38. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994;331(8):502-507.
39. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001;345(9):638-646.
40. Van CE. Challenges in the use of epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer. *Oncologist* 2006;11(9):1010-1017.
41. Tsukihara H, Nakagawa F, Sakamoto K et al. Efficacy of combination chemotherapy using a novel oral chemotherapeutic agent, TAS-102, together with bevacizumab, cetuximab, or panitumumab on human colorectal cancer xenografts. *Oncol Rep* 2015;33(5):2135-2142.
42. Lv Y, Yang Z, Zhao L, Zhao S, Han J, Zheng L. The efficacy and safety of adding bevacizumab to cetuximab- or panitumumab-based therapy in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): a meta-analysis from randomized control trials. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(1):334-345.
43. Lv ZC, Ning JY, Chen HB. Efficacy and toxicity of adding cetuximab to chemotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: a meta-analysis from 12 randomized controlled trials. *Tumour Biol* 2014;35(12):11741-11750.
44. Rosai J, Ackerman LV. *Surgical Pathology*. 10th Edition. 2011. Mosby.
45. Benedix F, Schmidt U, Mroczkowski P, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Colon carcinoma--classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite?--Analysis of 29,568 patients. *Eur J Surg Oncol* 2011;37(2):134-139.

46. Nawa T, Kato J, Kawamoto H et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23(3):418-423.
47. Maus MK, Hanna DL, Stephens CL et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J* 2015;15(4):354-362.
48. Gibbs NM. Undifferentiated carcinoma of the large intestine. *Histopathology* 1977;1(1):77-84.
49. Barresi V, Reggiani BL, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol* 2015;30(9):1059-1067.
50. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145(1):148-156.
51. Messerini L, Ciantelli M, Baglioni S, Palomba A, Zampi G, Papi L. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. *Hum Pathol* 1999;30(6):629-634.
52. Crissman JD. Adenosquamous and squamous cell carcinoma of the colon. *Am J Surg Pathol* 1978;2(1):47-54.
53. Choi JY, Jung SA, Shim KN et al. Meta-analysis of predictive clinicopathologic factors for lymph node metastasis in patients with early colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 2015;30(4):398-406.
54. Tacconi C, Correale C, Gandelli A et al. Vascular endothelial growth factor C disrupts the endothelial lymphatic barrier to promote colorectal cancer invasion. *Gastroenterology* 2015;148(7):1438-1451.
55. Logan-Collins JM, Lowy AM, Robinson-Smith TM et al. VEGF expression predicts survival in patients with peritoneal surface metastases from mucinous adenocarcinoma of the appendix and colon. *Ann Surg Oncol* 2008;15(3):738-744.

56. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol* 2002;26(2):179-189.
57. Davidson BR, Sams VR, Styles J, Deane C, Boulos PB. Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1990;65(4):967-970.
58. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007;446(7137):765-770.
59. De Rosa M., Pace U, Rega D et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2015.
60. Chin CC, Wang JY, Changchien CR, Huang WS, Tang R. Carcinoma obstruction of the proximal colon cancer and long-term prognosis--obstruction is a predictor of worse outcome in TNM stage II tumor. *Int J Colorectal Dis* 2010;25(7):817-822.
61. Wang HS, Lin JK, Mou CY et al. Long-term prognosis of patients with obstructing carcinoma of the right colon. *Am J Surg* 2004;187(4):497-500.
62. Dukes C. Histological Grading of Rectal Cancer: (Section of Pathology). *Proc R Soc Med* 1937;30(4):371-376.
63. ASTLER VB, COLLIER FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139(6):846-852.
64. AJCC. Cancer Staging Manual. Sixth Edition. 2002. Springer-Verlag.
65. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-767.
66. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-170.
67. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;329(27):1977-1981.



68. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987;93(5):1009-1013.
69. Bosman F, Yan P. - Molecular pathology of colorectal cancer. - *Pol J Pathol* 2014 Dec;65(4):257-66 2004;-66.
70. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* 2014;65(4):257-266.
71. Bosman FT. Molecular pathology of colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet* 1999;86(2):112-117.
72. Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998. *Cancer Res* 1999;59(1):249-256.
73. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol* 2009;4:343-364.
74. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375(9719):1030-1047.
75. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260(5109):816-819.
76. Jass JR, Biden KG, Cummings MC et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999;52(6):455-460.
77. Ward R, Meagher A, Tomlinson I et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001;48(6):821-829.
78. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002;84(1):27-47.
79. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer* 2005;93(4):472-477.

80. Catani MV, Costanzo A, Savini I et al. Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J* 2002;364(Pt 2):441-447.
81. Hickman MJ, Samson LD. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19):10764-10769.
82. Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 2007;26(36):5169-5183.
83. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999;6(12):1169-1173.
84. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90(4):809-819.
85. Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND, Moll UM. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res* 1999;59(13):3257-3263.
86. Chi SG, Chang SG, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Park JH. Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. *Cancer Res* 1999;59(12):2791-2793.
87. Li Y, Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 2007;26(15):2220-2225.
88. Guan M, Peng HX, Yu B, Lu Y. p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33(5):215-220.
89. Ullrich A, Gray A, Tam AW et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986;5(10):2503-2512.
90. Sekharam M, Zhao H, Sun M et al. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res* 2003;63(22):7708-7716.

91. Nguyen KT, Wang WJ, Chan JL, Wang LH. Differential requirements of the MAP kinase and PI3 kinase signaling pathways in Src- versus insulin and IGF-1 receptors-induced growth and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2000;19(47):5385-5397.
92. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16(1):3-34.
93. Nakamura K, Hongo A, Kodama J, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T. Down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor by antisense RNA can reverse the transformed phenotype of human cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;60(3):760-765.
94. El Yafi F., Winkler R, Delvenne P, Boussif N, Belaiche J, Louis E. Altered expression of type I insulin-like growth factor receptor in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2005;139(3):526-533.
95. Theiss AL, Fruchtmann S, Lund PK. Growth factors in inflammatory bowel disease: the actions and interactions of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(6):871-880.
96. Lund PK, Zimmermann EM. Insulin-like growth factors and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996;10(1):83-96.
97. Hakam A, Yeatman TJ, Lu L et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999;30(10):1128-1133.
98. Bustin SA, Jenkins PJ. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer. *Trends Mol Med* 2001;7(10):447-454.
99. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3(2):211-220.
100. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2(10):795-803.
101. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186.

102. Harada Y, Ogata Y, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR (kinase domain-containing receptor)/Flk-1 (fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2001;6(5):221-228.
103. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90(2):649-652.
104. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269(9):6271-6274.
105. Li J, Perrella MA, Tsai JC et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270(1):308-312.
106. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359(6398):843-845.
107. Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286(3):505-512.
108. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18(55):7908-7916.
109. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265(28):16737-16740.
110. Hamasaki Y, Kitzler J, Hardman R, Nettesheim P, Eling TE. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;304(1):226-234.
111. Bazan NG, Fletcher BS, Herschman HR, Mukherjee PK. Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(12):5252-5256.

112. Lanas A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. *Am J Med Sci* 2009;338(2):96-106.
113. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107(4):1183-1188.
114. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-1715.
115. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998;51(10):716-724.
116. Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74(5):759-765.
117. Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S et al. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer* 2001;92(4):869-874.
118. Pujol JL, Simony J, Jolimoy G et al. Hypodiploidy, Ki-67 growth fraction and prognosis of surgically resected lung cancers. *Br J Cancer* 1996;74(6):964-970.
119. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):55-63.
120. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860-867.
121. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001;70(4):478-490.
122. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001;193(6):727-740.

123. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539-545.
124. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073-1081.
125. Leitch EF, Chakrabarti M, Crozier JE et al. Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007;97(9):1266-1270.
126. Sharma R, Zucknick M, London R, Kacevska M, Liddle C, Clarke SJ. Systemic inflammatory response predicts prognosis in patients with advanced-stage colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7(5):331-337.
127. Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2012;38(5):451-466.
128. Marrugat J, Vila J, Pavesi M, Sanz F. [Estimation of the sample size in clinical and epidemiological investigations]. *Med Clin (Barc)* 1998;111(7):267-276.
129. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* 1960;20(1):37-46.
130. Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002;15(7):741-749.
131. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum* 2010;53(1):57-64.
132. Payá Romá A, Alenda Gonzalez C, Jover Martinez R, Aranda Lopez FI. Carcinoma colorrectal con alteración de la vía reparadora. Clave para su identificación. *Rev Esp Patol* 2006;39(4):201-208.

133. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000;89(10):2025-2037.
134. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F. Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. *Dis Colon Rectum* 1998;41(8):1033-1049.
135. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50(1):113-130.
136. Valera VA, Walter BA, Yokoyama N et al. Prognostic groups in colorectal carcinoma patients based on tumor cell proliferation and classification and regression tree (CART) survival analysis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(1):34-40.
137. Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(17):2645-2654.
138. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1(8545):1303-1306.
139. Lee YM, Law WL, Chu KW, Poon RT. Emergency surgery for obstructing colorectal cancers: a comparison between right-sided and left-sided lesions. *J Am Coll Surg* 2001;192(6):719-725.
140. Sarna SK. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity (1). *Dig Dis Sci* 1991;36(6):827-862.
141. Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery* 2000;127(4):370-376.
142. Phillips RK, Hittinger R, Fry JS, Fielding LP. Malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1985;72(4):296-302.
143. Carraro PG, Segala M, Cesana BM, Tiberio G. Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery. *Dis Colon Rectum* 2001;44(2):243-250.
144. Serpell JW, McDermott FT, Katrivessis H, Hughes ES. Obstructing carcinomas of the colon. *Br J Surg* 1989;76(9):965-969.

145. Rosen L, Abel ME, Gordon PH et al. Practice parameters for the detection of colorectal neoplasms--supporting documentation. The Standards Task Force. American Society of Colon and Rectal Surgeons. Dis Colon Rectum 1992;35(4):391-394.
146. Sugarbaker PH. Carcinoembryonic antigen (CEA) assays in obstructive colorectal cancer. Ann Surg 1976;184(6):752-757.
147. Cho YB, Yun SH, Hong JS et al. Carcinoma obstruction of the left colon and long-term prognosis. Hepatogastroenterology 2008;55(85):1288-1292.
148. Ohman U. Prognosis in patients with obstructing colorectal carcinoma. Am J Surg 1982;143(6):742-747.
149. NICKELL DF, DOCKERTY MB. The 5 year survival rate in cases of completely obstructing annular carcinoma of the descending colon and sigmoid; a pathologic study. Surg Gynecol Obstet 1948;87(5):519-524.
150. Korenaga D, Ueo H, Mochida K et al. Prognostic factors in Japanese patients with colorectal cancer: the significance of large bowel obstruction--univariate and multivariate analyses. J Surg Oncol 1991;47(3):188-192.
151. Taylor CR. The total test approach to standardization of immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med 2000;124(7):945-951.
152. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. Am J Surg Pathol 2001;25(9):1204-1207.
153. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. Histopathology 2006;49(4):411-424.
154. Gil J, Wu HS. Applications of image analysis to anatomic pathology: realities and promises. Cancer Invest 2003;21(6):950-959.
155. Sean M.Hartig. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. Current Protocols in Molecular Biology 2013;102:14.15.1-14.15.12.
156. Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2012;20(1):82-90.



157. Demir L, Ekin N, Erten C et al. The impact of cell proliferation markers and p53 mutation status on prognosis of non-metastatic colon cancer. *J Surg Oncol* 2014;109(7):665-675.
158. Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De SD, Manzione L. Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol* 2004;25(5-6):258-263.
159. Kim NK, Park JK, Lee KY et al. p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8(5):418-424.
160. Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg* 2005;92(8):1002-1007.
161. Peng Y, Wang L, Gu J. Elevated preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) and Ki67 is predictor of decreased survival in IIA stage colon cancer. *World J Surg* 2013;37(1):208-213.
162. Saleh HA, Jackson H, Banerjee M. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins: correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(3):175-182.
163. Sun XF. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):165-170.
164. Brianezi G, Minicucci EM, Marques ME, Miot HA. Evaluation epidermal p53 immunostaining by digital image analysis. *Skin Res Technol* 2013;19(1):e108-e112.
165. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58(15):3455-3460.
166. Brown SR, Finan PJ, Hall NR, Bishop DT. Incidence of DNA replication errors in patients with multiple primary cancers. *Dis Colon Rectum* 1998;41(6):765-769.

167. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2513-2519.
168. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246(4935):1306-1309.
169. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
170. Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A, Matsuo K, Tanikawa K. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1998;93(2):249-252.
171. Hyodo I, Doi T, Endo H et al. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* 1998;34(13):2041-2045.
172. Dittadi R, Meo S, Fabris F et al. Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different blood compartments. *Int J Biol Markers* 2001;16(2):87-96.
173. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77(6):956-964.
174. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;5(3):487-491.
175. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009;45(11):1924-1934.
176. Wang Y, Yao X, Ge J, Hu F, Zhao Y. Can vascular endothelial growth factor and microvessel density be used as prognostic biomarkers for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:102736.
177. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55(17):3785-3789.

178. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93(5):705-716.
179. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266(20):12866-12872.
180. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(7):3336-3340.
181. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999;282(13):1254-1257.
182. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332(3):F105-F126.
183. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4(10):591-602.
184. Durai R, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis* 2005;20(3):203-220.
185. Li ZJ, Ying XJ, Chen HL et al. Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013;19(43):7788-7794.
186. Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res* 1998;58(17):4008-4014.
187. Reinmuth N, Liu W, Fan F et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3259-3269.

188. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389(6647):191-194.
189. Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Putzer BM. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* 2002;62(13):3598-3602.
190. Yokomizo A, Mai M, Tindall DJ et al. Overexpression of the wild type p73 gene in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18(8):1629-1633.
191. Dominguez G, Garcia JM, Pena C et al. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol* 2006;24(5):805-815.
192. Liu L, Cui X, Sakaguchi T, Sasaki M, Suda T, Hatakeyama K. Expression of p73 in colorectal carcinoma: clinicopathological relevance. *J Int Med Res* 2001;29(4):297-303.
193. Tannapfel A, Wasner M, Krause K et al. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(13):1154-1158.
194. Miettinen M, El-Rifai W, Sobin HL, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002;33(5):478-483.
195. Kimura T, Tanaka S, Haruma K et al. Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol* 2000;16(1):55-64.
196. Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1992;15(4):317-320.
197. Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, Tavelin B, Rutegard JN, Stenling R. Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer* 1999;79(3-4):577-581.

198. Cascinu S, Ligi M, Graziano F et al. S-phase fraction can predict event free survival in patients with pT2-T3N0M0 colorectal carcinoma: implications for adjuvant chemotherapy. *Cancer* 1998;83(6):1081-1085.
199. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361(25):2449-2460.
200. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196(3):254-265.
201. Famulski W, Sulkowska M, Wincewicz A et al. P53 correlates positively with VEGF in preoperative sera of colorectal cancer patients. *Neoplasma* 2006;53(1):43-48.
202. Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y et al. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 2006;49(3):392-398.
203. Peters G, Gongoll S, Langner C et al. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer. *Virchows Arch* 2003;443(2):139-145.
204. Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VL. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2015;21(22):6924-6930.
205. Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B et al. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis* 2008;17(4):411-417.
206. Bustin SA, Dorudi S, Phillips SM, Feakins RM, Jenkins PJ. Local expression of insulin-like growth factor-I affects angiogenesis in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2002;23(3):130-138.
207. Di PA, Memoli A, Apicella A et al. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2000;19(48):5517-5524.

208. Zhang ZY, Zhang H, Adell G, Sun XF. Endosialin expression in relation to clinicopathological and biological variables in rectal cancers with a Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy. *BMC Cancer* 2011;11:89.
209. Lau LM, Wolter JK, Lau JT et al. Cyclooxygenase inhibitors differentially modulate p73 isoforms in neuroblastoma. *Oncogene* 2009;28(19):2024-2033.
210. Sakuma K, Fujimori T, Hirabayashi K, Terano A. Cyclooxygenase (COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1999;34(2):189-194.
211. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F et al. Celecoxib modulates the expression of cyclooxygenase-2, ki67, apoptosis-related marker, and microvessel density in human cervical cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2003;9(12):4324-4331.
212. Mao JT, Fishbein MC, Adams B et al. Celecoxib decreases Ki-67 proliferative index in active smokers. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):314-320.
213. Shin IY, Sung NY, Lee YS et al. The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: cathepsin D, p53, COX-2, epidermal growth factor receptor, C-erbB-2, and Ki-67. *Gut Liver* 2014;8(1):13-23.
214. Nahor I, Abramovitch S, Engeland K, Werner H. The p53-family members p63 and p73 inhibit insulin-like growth factor-I receptor gene expression in colon cancer cells. *Growth Horm IGF Res* 2005;15(6):388-396.
215. Werner H. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene* 2012;31(22):2703-2714.
216. Arvai KJ, Hsu YH, Lee LA, Jones D. A Transition Zone Showing Highly Discontinuous or Alternating Levels of Stem Cell and Proliferation Markers Characterizes the Development of PTEN-Haploinsufficient Colorectal Cancer. *PLoS One* 2015;10(6):e0131108.
217. McArdle CS, Hole DJ. Emergency presentation of colorectal cancer is associated with poor 5-year survival. *Br J Surg* 2004;91(5):605-609.
218. Maeda C, Hidaka E, Mori Y et al. Tumor Diameter Is an Easy and Useful Predictor of Recurrence in Stage II Colorectal Cancer. *Dig Surg* 2015;32(5):338-343.

219. Hogan J, Chang KH, Duff G et al. Lymphovascular invasion: a comprehensive appraisal in colon and rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2015;58(6):547-555.
220. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001;47(4):624-630.
221. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88(7):1739-1757.





## **VIII.- ANEXO**



## Cuaderno de Recogida de Datos

Nº \_\_\_\_

Nombre:	NHC:		Nº Biopsia:
Edad:	Sexo:		
<b>Estenosis:</b> Sí__    NO__			
<b>Localización del tumor:</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Ciego    __</div> <div>Colon derecho    __</div> <div>Colon transverso    __</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Colon izquierdo    __</div> <div>Colon sigmoides    __</div> <div>Recto    __</div> </div>			
<b>Estirpe:</b> Extensión local: T ____ Adenopatías (N): ____/____ Metástasis: nº ____    loc: _____ TNM: _____		Tamaño (cm): _____	
Obstrucción completa: Sí__    NO__ Suboclusión:    Sí__    NO__ Crisis:    única ____    varias (nº) ____ Rectorragias:    Sí__    NO__ Melenas:    Sí__    NO__ CEA pre: _____    CEA post: _____			
<b>Tratamiento adyuvante:</b> Exitus:    Sí__ NO__    Sobrevida (meses): _____ Metástasis: nº ____    loc: _____ Recidiva: Sí__ NO__ Tiempo de aparición de recidiva/metástasis (meses): _____			
	<b>Intensidad</b>	<b>Extensión</b>	<b>Valoración Final</b>
<b>IGF-1R</b>	____, ____	____, ____	
<b>p73</b>	____, ____	____, ____	
<b>MLH-1</b>	____, ____	____, ____	
<b>MSH-2</b>	____, ____	____, ____	
<b>VEGF</b>	____, ____	____, ____	
<b>COX-2</b>	____, ____	____, ____	
<b>Ki-67</b>	____, ____	____, ____	

